

**Biotransformation von Metall(oid)en
zu flüchtigen Derivaten durch mikrobielle
Biozönosen und Reinkulturen von anaeroben
Prokaryonten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades**

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geografie

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jörg Meyer

aus Bottrop

Oktober 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Hensel
2. Gutachter: Prof. Dr. Hirner

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I-III
---------------------------	--------------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV-V
------------------------------	-------------

TABELLENVERZEICHNIS	VI-VII
----------------------------	---------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII-IX
------------------------------	----------------

1. EINLEITUNG	1
----------------------	----------

2. MATERIAL UND METHODEN	9
---------------------------------	----------

2.1	Material	9
-----	----------	---

2.1.1	Herkunft von Chemikalien	9
-------	--------------------------	---

2.1.2	Geräte	9
-------	--------	---

2.1.3	Mikroorganismen	11
-------	-----------------	----

2.2	Methoden	12
-----	----------	----

2.2.1	Anzucht von Methanoarchaea und anaeroben Bacteria	12
-------	---	----

2.2.2	Entnahme von Umweltproben zur Bestimmung der Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten	12
-------	--	----

2.2.2.1	Entnahme und Inkubation von Boden-Proben	12
---------	--	----

2.2.2.2	Entnahme und Inkubation von Fäzes-Proben	13
---------	--	----

2.2.3	Anreicherung und Isolierung Metall(oid)-volatilisierender Prokaryonten	14
-------	---	----

2.2.3.1	Verwendete Medien	14
---------	-------------------	----

2.2.3.2	Herstellung von Agar-Agar-Platten zur Isolierung anaerober Prokaryonten aus Umweltproben	15
---------	---	----

2.2.3.3	Herstellung von Verdünnungsreihen	16
---------	-----------------------------------	----

2.2.4	Molekularbiologische Methoden	17
-------	-------------------------------	----

2.2.4.1	DNS-Extraktion aus Umweltproben und Reinkulturen	17
---------	--	----

2.2.4.2	Amplifizierung des 16S rDNS-Gens mittels PCR_____	17
2.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNS_____	18
2.2.4.4	Extraktion von dsDNS und ssDNS aus TAE-Agarosegelen_____	19
2.2.4.5	Populationsuntersuchungen mittels SSCP-Methodik_____	19
2.2.4.6	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung_____	21
2.2.5	Analytische Methoden_____	24
2.2.5.1	PT-GC/ICP-MS Analytik_____	24
2.2.5.2	Bestimmung von Methan mittels Gaschromatographie_____	28
2.2.5.3	Ansätze zur Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Reinkulturen_____	29
2.2.5.4	<i>In vitro</i> Produktion von (CH ₃) ₃ Bi_____	29
2.2.5.5	Gesamtmetallbestimmung der Boden-Proben mittels RFA_____	29
2.2.5.6	Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter Wasser-, Stickstoff-, Schwefel-, Gesamt-Kohlenstoff-Gehalt, organischer Anteil und pH-Wert_____	30
2.2.6	Statistik und Ergebnisdarstellung_____	30
3.	ERGEBNISSE_____	31
3.1	Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus einem Auengley und einem industriell überprägten Boden_____	31
3.1.1	Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter_____	32
3.1.2	Ergebnisse der Gesamtmetallbestimmung durch RFA_____	33
3.1.3	Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in aufgeschlammten Boden-Proben_____	34
3.1.4	Fähigkeit von anaerob kultivierten Boden-Isolaten zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten_____	39
3.1.5	Charakterisierung von ASI-1: Phylogenetische und physiologische Eigenschaften, Metall(oid)-Derivatisierung sowie Abundanz im Auengley_____	41
3.1.5.1	Phylogenetische Position und taxonomische Zuordnung von ASI-1_____	41
3.1.5.2	Physiologische Eigenschaften von ASI-1_____	44

3.1.5.3	Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten durch anaerob inkubierte ASI-1 Kulturen	45
3.1.5.4	Abundanz von ASI-1 im Auengley	48
3.2	Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes- Proben	50
3.2.1	Produktion flüchtiger Bismut-Derivate durch anaerob inkubierte Fäzes-Proben in Abhängigkeit von der Bismut- Konzentration	51
3.2.2	Produktion von Methan in anaerob inkubierten Fäzes- Proben	54
3.2.3	Untersuchungen zur Mikrofloren-Zusammensetzung der Humanfäzes-Proben über SSCP	56
3.2.4	Versuche zur Anreicherung von Methanoarchaea aus Humanfäzes	61
3.3	Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate durch Reinkulturen von Methanoarchaea und Bacteria	63
3.3.1	Einfluss von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ auf das Wachstum von <i>B. thetaiotaomicron</i>	71
4.	DISKUSSION	72
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	LITERATURVERZEICHNIS	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau der „Purge and Trap“-Analyseapparatur	24
Abb. 2:	Typisches Chromatogramm der PT-GC/ICP-MS Analyse flüchtiger Arsen-Derivate in der Gasphase einer inkubierten Boden-Probe des Auengleys aus einer Tiefe von 30-40 cm	35
Abb. 3 a-e:	Produzierte flüchtige Metall(oid)-Derivate in anaerob inkubierten Auengley-Proben verschiedener Bodentiefen	38
Abb. 4:	Beispielhafter Zeitverlauf der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate einer anaerob inkubierten Auengley-Probe der Tiefe 30-40 cm über einen Zeitraum von ca. 4 Monaten	39
Abb. 5:	Phasenkontrast-Aufnahme von ASI-1	41
Abb. 6:	16S rDNS Sequenz des Boden-Isolats ASI-1	42
Abb. 7:	Phylogenetischer Baum von Isolat ASI-1 auf der Grundlage von 16S rDNS Sequenz-Vergleichen	43
Abb. 8:	Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten in anaerob inkubierten ASI-1 Kulturen in Gegenwart eines 1 μ M Metall(oid)-Gemisches	45
Abb. 9:	Produktion flüchtiger Arsen-Derivate durch Arsen-adaptierte und nicht-adaptierte ASI-1 Kulturen	46
Abb. 10 a-b:	Digitale Epifluoreszenz-Aufnahme von ASI-1 Zellen nach FISH mit der Sonde CGly55 (a) und DAPI-Färbung (b)	49
Abb. 11:	Zusammenhang zwischen Bi-Gehalt und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion der Fäzes-Proben. Dargestellt sind alle Fäzes-Proben nach CBS-Zugabe, die einen Bi-Gehalt > 1 mmol/kg TG aufwiesen	54
Abb. 12:	Zusammenhang zwischen CH_4 -Produktion und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion der Fäzes-Proben. Dargestellt sind alle Fäzes-Proben nach CBS-Zugabe, die einen Bi-Gehalt > 1 mmol/kg TG aufwiesen	55
Abb. 13:	SSCP-Profil der 16S rDNS der Fäzes-Proben von Proband MLow nach Amplifikation mit universellen Primern (Zielpopulation: Bacteria und Archaea) und durch Nested-PCR Amplifikationen mittels Archaea-spezifischer Primer (Zielpopulation: Archaea)	57

- Abb. 14: SSCP-Profil gelelektrophoretischer Auftrennung der 16S rDNS-Fragmente, die mit Archaea-spezifischen Primern aus Fäzes-Proben von den Probanden MLow, CS, KV und AP gewonnen wurden. 1-6 bezeichnen die Fragmente, für die die 16S rDNS-Sequenz ermittelt wurde_____59
- Abb. 15 a-h: Digitale Phasenkontrast- (a, c, e, g) u. Epifluoreszenz-Aufnahmen (b, d, f, h) von Methanoarchaea aus Humanfäzes-Anreicherungskulturen_____62
- Abb. 16 a-b: Verlauf der CH₄-Produktion in anaerob inkubierten *M. vanniellii*-Kulturen (a) und der optischen Dichte in anaerob gezogenen *Bacteroides vulgatus*-Kulturen (b)_____65
- Abb. 17: Einfluss von (CH₃)₃Bi auf das Wachstum von *B. thetaiotaomicron*____71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Durchschnittliches Vorkommen von Metall(oid)en in der kontinentalen Erdkruste_____	2
Tab. 2:	Biomethylierung der Elemente: Zuordnung zu den verantwortlichen Organismengruppen_____	3
Tab. 3:	In dieser Untersuchung eingesetzte Organismen_____	11
Tab. 4:	Primer-Kombinationen für die Amplifikation der 16S rDNS der archaealen-, der methanoarchaealen-, der bacterialen- und der Gesamt-Population aus Reinkulturen und Humanfäzes-Proben_____	18
Tab. 5:	Komponenten zur Herstellung eines SSCP-Gels_____	20
Tab. 6:	Betriebsparameter des ICP-MS_____	26
Tab. 7:	Betriebsparameter des GC_____	28
Tab. 8:	Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter von Auengley und Industrie-Boden aus Tiefen von 15-75 cm_____	32
Tab. 9:	Metall(oid)-Gehalte der untersuchten Böden im Vergleich zu Prüfwerten laut Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BbodSchV, 1999)_____	33
Tab. 10:	Flüchtige Metall(oid)-Derivate in der Gasphase anaerob inkubierter Proben des Auengleys und des Industrie-Bodens aus einer Bodentiefe von 15-75 cm_____	36
Tab. 11:	Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate von Boden-Isolaten, die aus Auengley Boden-Proben der Tiefe 15-75 cm stammen_____	40
Tab. 12:	Physiologische Eigenschaften von ASI-1 im Vergleich zu nah verwandten <i>C. glycolicum</i> -Stämmen_____	44
Tab. 13:	Vergleich der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Kulturen von ASI-1 und zwei <i>C. glycolicum</i> -Stämmen_____	47
Tab. 14:	Ziel-Sequenzen für die Sonde CGly55 mit bis zu 2 Fehlpaarungen - ermittelt mit dem ARB software package_____	48

Tab. 15:	Metall(oid)-Gehalte der untersuchten Humanfäzes-Proben (n = 64) vor und nach Zugabe von CBS_____	51
Tab. 16:	Nachweis flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes- Proben vor und nach Zugabe von CBS_____	52
Tab. 17:	Maximale Produktions-Raten flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes-Proben vor und nach Zugabe von CBS_____	53
Tab. 18:	Primer-Kombinationen, die zur Amplifikation der 16S rDNS der archaealen-, der methanoarchaealen- und der Gesamt- population aus Humanfäzes-Proben eingesetzt wurden_____	58
Tab. 19:	Amplifizierte 16S rDNS-Fragmente aus Humanfäzes und phylogenetische Interpretation der Sequenzdaten_____	60
Tab. 20:	In dieser Untersuchung eingesetzte bakterielle Stämme und ihre taxonomische Zugehörigkeit_____	63
Tab. 21:	In dieser Untersuchung eingesetzte Methanoarchaea und ihre taxonomische Zugehörigkeit_____	64
Tab. 22 a-b:	Flüchtige Metall(oid)-Derivate, die nach Zusatz einer Standard- lösung der Metall(oid)-Salze von As, Sb, Bi, Se, Te und Hg durch methanoarchaeale und bakterielle Kulturen produziert wurden_____	66
Tab. 23 a-b:	Maximale Bismut- und Selen-Volatilisierungsraten von methanoarchaealen (a) und bacterialen (b) Reinkulturen_____	69
Tab. 24:	Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus einem Auengley im Vergleich zu anderen Habitaten_____	73

Abkürzungsverzeichnis

x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
%	Prozent (der hundertste Teil von)
μ	mikro (10^{-6})
®	Eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
amu	atomare Masseneinheit (atomic mass units)
APS	Ammoniumpersulfat
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti
ca.	circa
CBS	kolloidales Bismut-Subcitrat (Colloidal Bismuth Subcitrate)
cps	counts per second
d	Tage
d.h.	das heißt
DL	unter Detektions-Limit
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
etc.	et cetera
f	femto (10^{-15})
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
g	Gramm
h	Stunde, Stunden
ICP-MS	Massenspektrometrie mit Plasma-Anregung
insb.	insbesondere
K	Kelvin
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
m	milli (10^{-3})
max	maximum
Mill.	Million, Millionen
min	Minuten
M	molar (mol/l)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
n	nano (10^{-9})

n	Anzahl der Stichproben
p	piko (10^{-12})
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionen-Konzentration
ppm	der millionste Teil von (parts per million)
PT-GC	"Purge and Trap"-Gaschromatographie
r	ribosomal
RFA	Röntgen-Fluoreszenz-Analytik
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde, Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Typ-Stamm
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	Trockengewicht
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit
V	Volt
VE	Vollentsalztes Wasser
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Biotransformation von Metallen und Metalloiden (Metall(oid)e) zu flüchtigen, methylierten oder hydrierten Derivaten befassen sich ausschließlich mit den anaeroben Habitaten des Bodens und des menschlichen Darms.

Um die Mikroorganismen dieser Habitate zu identifizieren, die für solche Transformationen verantwortlich sind, wurde das Transformations-Potenzial von Reinkulturen der Prokaryonten analysiert, die aus diesen Habitaten stammen oder ihnen als zugehörig gelten.

Die Transformation von Metall(oid)en durch Mikroorganismen ist ein seit langem bekannter Prozess (Challenger, 1933, 1945) und ein wichtiger Teil im biochemischen Kreislauf von Metallen wie Bismut, Quecksilber, Zinn, Blei oder Metalloiden wie Arsen, Antimon, Selen und Tellur, in dessen Verlauf es durch die Alkylierungs- bzw. Hydrierungs-Reaktionen zu einer grundlegenden Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften des jeweiligen Metall(oid)s kommt.

Vorkommen von Metallen und Metalloiden in der Umwelt

Fast alle chemischen Elemente findet man in der Erdkruste einschließlich Ozeanen und Atmosphäre. Dabei macht der Sauerstoff mit 46,6 Gewichtsprozent den größten Teil aus, gefolgt von Silicium mit 27,7 % und Aluminium mit 8,1 %. Weitere wichtige Bestandteile sind Eisen (4,7 %), Calcium (3,6 %), Natrium (2,8 %), Kalium (2,6 %) und Magnesium (2,1 %). Die restlichen 85 Elemente, darunter auch die in dieser Studie untersuchten Metalle und Metalloide (Tab. 1), liegen jeweils unter einem Prozent, die meisten sind nur in Spuren vorhanden.

Tab. 1: Durchschnittliches Vorkommen von Metall(oid)en in der kontinentalen Erdkruste (Rutherford, Lexikon der Elemente, www.uniterra.de/rutherford).

Metall(oid)	Konzentration (ppm)
Antimon	0,2
Arsen	1,5
Bismut	0,048
Blei	14,0
Selen	0,05
Tellur	0,005
Quecksilber	0,05
Zinn	2,2

Die in den Gesteinen der Erdkruste gebundenen Metall(oid)e gelangen über physikalische und chemische Verwitterungs-Prozesse in die Biosphäre und unterliegen dort verschiedenen Umwandlungen, vornehmlich durch Beteiligung von Mikroorganismen.

Ein weiterer Weg des Eintrags von Metall(oid)en in die Umwelt geschieht über die Gewinnung von Metall-Erzen durch den Menschen aus Lagerstätten der Erdkruste. Die gewonnenen und aufgereinigten Metall(oid)e werden in der Industrie in vielfältigen Produkten weiterverarbeitet. Durch das Ausbringen solcher Produkte in der Landwirtschaft (z.B. Dünger, Pestizide, Fungizide) oder über die Entsorgung von gebrauchten Produkten (Batterien, Verpackungsmaterialien, Baumaterialien etc.) über Mülldeponien gelangen diese Metall(oid)e zurück in den Stoffkreislauf der Biosphäre. Auch in pharmazeutischen Produkten finden Metall(oid)e Anwendung. Ein einschlägiges Beispiel ist Bismut, das nicht nur bei der Produktion von Medikamenten (Medikamente gegen Magengeschwüre und Hämorrhoiden) Verwendung findet, sondern auch Bestandteil von Kosmetika ist. Für die hochdosierte Langzeit-Einnahme von Bismut-haltigen Medikamenten (z.B. Bismut-Subgallat oder -Subnitrat) wurden toxische Effekte wie Nierenleiden, Enzephalopathie, Osteoarthropathie, Gingivitis, Stomatitis oder Colitis beobachtet (Burns et al., 1974; Buge et al., 1974; Slikkerveer et al., 1989). Für die Einnahme gering dosierter Konzentrationen von kolloidalem Bismut-Subcitrat (Colloidal Bismuth Subcitrate, CBS), wie in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt, konnten allerdings keine toxischen Effekte beobachtet werden (Noach et al., 1995).

Durch diese vielfältigen Anwendungen kommt es zur Anreicherung von Metallen und Metalloiden in verschiedenen Bereichen unserer Umwelt wie Klärschlamm-

Stabilisierungsanlagen, aber auch Sedimenten; zudem sind Anreicherungen auch im menschlichen Körper durch ihre Zuführung über die Nahrung, Medikamente oder Kosmetika möglich.

Entstehung flüchtiger Metall(oid)-Derivate

Flüchtige Metall(oid)-Derivate entstehen durch Alkylierung oder Hydrierung der Elemente, wobei die Umsetzungen entweder rein chemisch erfolgen oder enzymatisch katalysiert werden. Die Methylierung von Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatomen wird von Organismen als Teil ihres Stoffwechsels betrieben. Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Prokaryonten verschiedener Entwicklungslinien auch zur Methylierung von Metallen und Metalloiden befähigt. Tab. 2 zeigt eine Übersicht über biomethylierbare Elemente und über die für die Umsetzungen verantwortlichen Organismen.

Tab. 2: Biomethylierung der Elemente: Zuordnung zu den verantwortlichen Organismengruppen (verändert nach Thayer, 2002)

Periodenzahl								
9	10	11	12	13	14	15	16	17
				Al	Si	P	S	Cl
				n.n.	n.n.	1	1-4	2,3
Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br
1-4	1	n.n.	n.n.	n.n.	1(?)	1-4	1-4	2,3
			Cd	In	Sn	Sb	Te	I
			1(?)	n.n.	1,2	1,2	1,2,4	1-3
			Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At
			1	1	1,2(?)	1	1,2	n.n.

Methylierung und Organismenklassen: (1) Prokaryonten (Bacteria, Archaea); (2) Pilze, Algen, Hefen; (3) Pflanzen; (4) Tiere; n.n., nicht nachgewiesen.

Als Haupt-Produzenten gelten verschiedene Vertreter der Bacteria, der Archaea (insbes. Methanoarchaea) und der Eucarya. Da bislang nur wenige Organismen auf ihre Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten hin untersucht wurden, sind die Erkenntnisse diesbezüglich noch sehr lückenhaft. Für eine Reihe von Elementen wie z.B. Arsen, Antimon, Bismut, Selen, Tellur und

Quecksilber ist die Verflüchtigung von Metall(oid)en nachgewiesen worden oder gilt als sehr wahrscheinlich (Gadd, 1993; Michalke et al., 2000; Bentley et al., 2002; Thayer, 2002; Michalke et al., 2002, 2003, 2007; Craig, 2003; Meyer et al., 2007).

Jüngere Untersuchungen weisen der Gruppe der Methanoarchaea eine dominante Rolle bezüglich der Volatilisierung von Metall(oid)en in anaeroben Habitaten zu (Michalke et al., 2007). Von besonderem Interesse für die Entstehung flüchtiger Metall(oid)-Derivate in anaeroben Habitaten sind daher Vertreter der Methanoarchaea sowohl in Böden als auch in verschiedenen Organismen einschließlich des Menschen.

Mobilität von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten

Die Mobilität methylierter und hydrierter Metall(oid)-Derivate erhöht sich in der Regel stark im Vergleich zu ihren anorganischen Edukten. Permethylierte Metall(oid)e und entsprechende Hydrid-Derivate sind aufgrund ihres hohen Dampfdrucks flüchtig. Auch teilmethylierte Verbindungen weisen oft hohe Dampfdrücke auf. Durch die dadurch erhöhte Mobilität besteht die Gefahr der unkontrollierten Verteilung der Elemente in der Umwelt. So gelangen flüchtige Metall(oid)-Derivate in die Troposphäre und werden dort in Abhängigkeit ihrer Stabilität mehr oder weniger weit transportiert.

Toxizität von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten

Flüchtige Metall(oid)-Derivate zeigen meist eine erhöhte Toxizität, deren Ursache in der erhöhten Hydrophobizität und damit in einer erhöhten Membran-Permeabilität zu suchen ist.

Mit Ausnahme von Arsen und Selen, deren methylierte Produkte eine geringere Toxizität als die anorganischen Salze des Elements besitzen, geht von allen bislang untersuchten alkylierten Metall(oid)-Verbindungen eine größere Gefährdung biologischer Systeme aus (z.B. Behinderung des Ionentransports und der Energiekonservierung, Schädigung des Erbgutes) als von den anorganischen Edukten (Leonard et al., 1980; Thayer, 1984, 1995; Klimecki et al., 1995; Dopp et al., 2004).

Als Beispiele seien hier genannt: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$, $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$, für die eine Neurotoxizität nachgewiesen wurde (Sollmann et al., 1939; Hathaway et al., 1991; Laden et al., 2001), für $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ Gentoxizität (Andrewes et al., 2004). Organozinnverbindungen zeigen insbesondere gegenüber Algen, Fungi und Bacteria eine hohe Toxizität (Hallas et al., 1981a, 1981b; Pettibone et al., 1986, 1988).

Der Haupteffekt von methylierten Quecksilber-Verbindungen liegt beim Menschen in der Schädigung des zentralen Nervensystems (Craig, 2003), da Methylquecksilber in der Lage ist, die Blut-Gehirnschranke zu überwinden. In Säugetieren wurde eine gegenüber Fischen z.T. 100-fach stärkere Anreicherung im Gehirn nachgewiesen (Boenig, 2000). Zudem wurde für methylierte Quecksilber-Verbindungen der Einfluss auf Chromosomenabberationen in Säugetier-Zellen gezeigt (Fender et al., 1998; Ehrenstein et al., 2002).

Die Bioakkumulation organischer Quecksilber-Verbindungen in Speise-Fischen führte in Minamata (Japan) (Luke et al., 1982) zu tragischen Vergiftungen und die Anreicherung von Methylquecksilber beinhaltenden Fungiziden in Getreide zu Vergiftungen und Todesfällen im Irak (Bakir et al., 1973).

So geht durch die erhöhte Mobilität und Toxizität flüchtiger Metall(oid)-Derivate, insbesondere in anaeroben Habitaten, ein besonders hohes Gefährdungs-Potenzial für Mensch, Tier und Pflanze aus.

Flüchtige Metall(oid)-Derivate in anaeroben Habitaten

Zurückliegende Untersuchungen zur Entstehung von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten in der Umwelt weisen darauf hin, dass diese Verbindungen bevorzugt in anaeroben Habitaten entstehen, insbesondere dort, wo hohe biologische Aktivität und eine hohe Metall(oid)-Verfügbarkeit vorliegen.

So konnte beispielsweise in Feuchtgebieten (Wickenheiser et al., 1998a), Geothermalquellen (Hirner et al., 1998), Faulgasen von Kläranlagen und Mülldeponien (Feldmann et al., 1994, 1995), periodisch überfluteten Böden (Meyer et al., 2007), aber auch im menschlichen Darmtrakt (Hirner et al., 2004) die Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Entstehung flüchtiger Metall(oid)-Derivate der anaeroben Habitate des Bodens und des menschlichen Darms, da beide Habitat-Typen eine hohe mikrobielle Dichte aufweisen und somit gute Voraussetzungen für die Entstehung von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten bieten.

Der menschliche Darmtrakt bietet bis zu 100 Billionen Mikroorganismen Platz und beinhaltet damit 10-fach mehr mikrobielle Zellen als der Mensch körpereigene Zellen aufweist (Savage, 1977; Bäckhed et al., 2005). Obwohl der menschliche Darm mit Vertretern aller 3 Domänen des Lebens (Bacteria, Eucarya, Archaea) besiedelt ist, ist die Organismenvielfalt doch eher gering. So konnten für die Bacteria nur Vertreter von 8 der bis heute bekannten 55 Divisionen nachgewiesen werden, wobei Vertreter der Bacterioidetes und Firmicutes dominieren; Vertreter der Proteobacteria sind zwar weit verbreitet, jedoch nicht dominant (Seksik et al., 2003).

Lange Zeit galten Stämme der Arten *Methanobrevibacter smithii* und *Methanosphaera stadtmanae* (Miller et al., 1982, 1985) als einzige archaeale Vertreter der menschlichen Darmflora. Allerdings weisen neuere Untersuchungen auch auf das Vorliegen von Vertretern der Crenarchaeota hin (Rieu-Lesme et al., 2005).

Aufgrund von Atemluftuntersuchungen wird angenommen, dass etwa 30-80 % der Erdbevölkerung Methanoarchaea in ihrer Darm-Mikroflora aufweisen (Pitt et al., 1980; Segal et al., 1988; Hudson et al., 1993; Hackstein, 1995). In Untersuchungen von Brusa et al. (1993) wurden in Fäzes-Proben von 18 Probanden Zellzahlen von Methanoarchaea von 10^3 bis 10^{10} /g Trockengewicht nachgewiesen. Es wird angenommen, dass die Methanoarchaea eine wichtige Rolle im Polysaccharid-Abbau der Darm-Mikroflora einnehmen, da sie im Anschluss an den bacterialen Abbau von Polysacchariden zu kurzkettigen Fettsäuren, CO_2 und H_2 den Partialdruck von Wasserstoff durch die Bildung von Methan senken und so die mikrobielle Fermentationsleistung der Darm-Mikroorganismen erheblich steigern (Bäckhed et al., 2005).

Böden stellen neben Sedimenten die Haupt-Habitate der terrestrischen Biosphäre dar und weisen hohe Zellzahlen von Prokaryonten auf. Im Vergleich zum menschlichen Darmtrakt ist die Organismendichte mit durchschnittlich 10^9 Zellen pro g Boden (Whitman et al., 1998) aber eher gering. Die Vielfalt der Organismen ist hingegen sehr hoch. Reassoziations-Versuchen mit Einzelstrang-DNS (ssDNS) aus

verschiedenen Boden-Proben zufolge existieren zwischen 2.000 und 18.000 verschiedene mikrobielle Genome in 1 g Boden (Torsvik et al., 1990, 1996; Sandaa et al., 1999).

Mit Vertretern von mindestens 20 verschiedenen bacterialen Divisionen (Dunbar et al., 2002) sind Boden-Habitate deutlich vielfältiger als das Habitat des menschlichen Darms. Dominierend treten in der Regel Vertreter der Acidobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobiales, Firmicutes, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Gruppe, Nitrospira und Chloroflexaceae auf (Dunbar et al., 2002).

Für Böden wurde außerdem das Vorkommen von Vertretern der Crenarchaeota und der Euryarchaeota berichtet (Bintrim et al., 1997; Jurgens, 2002). Methanoarchaea kommen insbesondere in Boden-Habitaten vor, die ganzjährig oder periodisch überflutet sind, wie z.B. Böden von Reisfeldern (Min et al., 1997) und Auen.

Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das Potenzial der Mikroflora verschiedener Habitate zur Transformation von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Metall(oid)-Derivaten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden mit dem menschlichen Darm und verschiedenen Böden 2 Habitat-Typen ausgewählt, die aufgrund ihrer Prokaryonten-Dichte und/oder Prokaryonten-Vielfalt gute Voraussetzungen für die Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten bieten.

Bei den Bodenuntersuchungen wurde zwischen Habitaten mit geringer und hoher Metall(oid)-Belastung differenziert, um abschätzen zu können, inwieweit die zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten befähigte Mikroflora in der Lage ist, sich an extreme Bedingungen anpassen zu können.

Weiter sollte über klassische mikrobiologische Methoden Metall(oid)-verflüchtigende Prokaryonten aus dem jeweiligen Habitat isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en getestet werden. Mittels molekularbiologischer Methoden sollte Einblick in die Zusammensetzung der Metall(oid)-transformierenden Mikroflora unter *in situ*-Bedingungen erhalten werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herkunft von Chemikalien

Agarose:	Life Technologies, Eggenstein
Flüssiger Stickstoff und Trockeneis:	Messer-Griesheim, Frankfurt
Gase für ICP-MS (Ar, He), für Gas- chromatographie (N ₂ , H ₂ , O ₂), Methan- Standard (50,3 %) und Gase für Nährmedien (CO ₂ /H ₂):	Messer-Griesheim, Frankfurt
Hefeextrakt, Casitone:	Difco Lab., Detroit, Mich., USA
Standardlösungen für ICP-MS:	Kraft, Duisburg
Vectashield:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Taq-Polymerase:	GoTaq, Promega GmbH, Mannheim
Oligonukleotide:	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Fluka (Buchs, St. Gallen, Schweiz), Gerbu (Gaiberg), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p.a. Qualität auf.

2.1.2 Geräte

Anaerobenzelt:	Coy Lab. Inc., Vertrieb Töpfer GmbH, Göppingen
Bead Beater:	Scientific Industries, NY, USA
Dampfsterilisatoren:	Webeco Modell H, Webeco GmbH, Bad Schwartau Zirbus LVSA 40/60, Zirbus technology, Bad Grund

C-H-N-O-S Elementanalysator:	Typ EA 3000, HEKAtech GmbH, Wegberg
Flocken-Eisbereiter:	Scotsman AF100, Enodis Deutschland GmbH, Herborn
Gaschromatograph:	5890 Series II Gas Chromatograph, Hewlett Packard Company, USA
Gel-Dokumentations-Gerät:	ChemiDoc, BioRad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophorese-Kammern:	Makrophor 2010, LKB Bromma, Schweden Easy-Cast Electrophoresis System, Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
ICP-MS:	PlasmaQuad II, Fisions VG, Wiesbaden
Inkubatoren:	RFI-125 Inkubator, Infors AG, Bottmingen, Schweiz Certomat H, Wolf Laboratories Limited, York, Great Britain Infors Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Mikroskope:	Olympus BH-2 RFCA, Olympus, Hamburg Olympus CHT, Olympus, Hamburg
Mikrowellen-Druckaufschlusssystem:	MARS 5, CEM, Kamp Lintfort
pH-Meter:	WTW pH 197, WTW GmbH, Weilheim
Photometer:	Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg Genesys 20, Thermo Spectronics, Rochester, NY, USA
Reinstwasseranlage:	Seralpur pro 90 CN, Elga-Seral, Ransbach-Baumbach
Spannungsgeber:	Consort E835, Owl Separation Systems, Portsmouth, USA Macrodrive 5, LKB Bromma, Schweden
Speed Vac System:	Speed VacSc100, Savant, Framingdale, NY, USA

Thermo Cycler:	Eppendorf Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät:	Labsonic U, Braun AG, Melsungen
UV-Flächenstrahler:	N-90 M, Faust, Wiesloch
Zentrifugen:	Avanti J-25, Beckmann, München
	Biofuge pico, Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Universal 32R, Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
	Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg
	Sigma 3K 12, Braun AG, Melsungen

2.1.3 Mikroorganismen

Alle hier aufgelisteten Organismen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen.

Tab. 3: In dieser Untersuchung eingesetzte Organismen.

Methanoarchaea	Bacteria
<i>Methanospaera stadtmanae</i> , DSM 3091 ^T	<i>Bacillus alcalophilus</i> , DSM 485 ^T
<i>Methanobrevibacter smithii</i> , DSM 2374	<i>Bacillus licheniformis</i> , DSM 13 ^T
<i>Methanobrevibacter smithii</i> , DSM 2375	<i>Bacteroides coprocola</i> , DSM 17136 ^T
<i>Methanococcus vanniellii</i> , DSM 1224 ^T	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , DSM 2079 ^T
<i>Methanococcus maripaludis</i> , DSM 2771	<i>Bacteroides vulgatus</i> , DSM 1447 ^T
<i>Methanolacinia paynteri</i> , DSM 2545 ^T	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , DSM 20082
<i>Methanolobus tindarius</i> , DSM 2278 ^T	<i>Butyrivibrio crossotus</i> , DSM 2876 ^T
<i>Methanoplanus limicola</i> , DSM 2279 ^T	<i>Clostridium aceticum</i> , DSM 1496 ^T
<i>Methanosarcina barkeri</i> , DSM 800 ^T	<i>Clostridium leptum</i> , DSM 753 ^T
<i>Methanosarcina mazei</i> , DSM 3647	<i>Collinsella intestinalis</i> , DSM 13280 ^T
<i>Methanobacterium formicicum</i> , DSM 1535 ^T	<i>Desulfovibrio piger</i> , DSM 749
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> , DSM 1053 ^T	<i>Eubacterium bifforme</i> , DSM 3989 ^T
	<i>Eubacterium eligens</i> , DSM 3376 ^T
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , DSM 20079 ^T
	<i>Rhizobium radiobacter</i> , DSM 30150
	<i>Rhizobium trifolii</i> , DSM 1980
	<i>Ruminococcus hansenii</i> , DSM 20583 ^T

^T = Typ-Stamm

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Methanoarchaea und anaeroben Bacteria

Die unter 2.1.3 aufgelisteten Organismen wurden in einem Volumen von 50 ml mit dem von der DSMZ empfohlenen Medium in Serumflaschen (120 ml), die mit Butylstopfen verschlossen wurden, anaerob angezogen (www.dsmz.de). Entsprechend dem jeweiligen Organismus wurde die Gasphase der Kulturen mittels einer Gaswechselanlage durch N₂ oder durch das Gasgemisch CO₂/H₂ (20/80 %; v/v) getauscht.

Die jeweiligen Kulturansätze wurden mit L-Cystein (0,3-0,5 g/l) reduziert und 1 %-ig mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft. Als Redox-Indikator wurde Resazurin (0,0001 %; v/v) hinzugegeben. Das Medium wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt und unter Rühren auf Serumflaschen verteilt.

Wachstumsversuche mit dem Bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* wurden in 15 ml Hungate-Schraubröhrchen mit Butylstopfen durchgeführt.

Die Kultivierung aller Organismen erfolgte unter moderatem Schütteln (150 rpm) bei 37°C. Zum Schutz vor Photolyse der flüchtigen Metall(oid)-Derivate wurde der Inkubator mittels Aluminiumfolie verdunkelt.

2.2.2 Entnahme von Umweltproben zur Bestimmung der Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten

2.2.2.1 Entnahme und Inkubation von Boden-Proben

Zur Analyse der Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten in Boden-Habitaten wurden ein Auengley und ein Boden eines Altindustriestandortes ausgewählt. Die Probennahmegebiete befanden sich in der Nähe von Essen-Werden an der Ruhr (Auengley) und in Gelsenkirchen auf einem Altindustriestandort.

Die Probennahme erfolgte mit einer Pürkhauer-Bohrstange in ca. 20 cm Abstand. Durch Ausmessen der Pürkhauer-Bohrstange konnte das Probenmaterial folgenden Schichten zugeordnet werden: 15-30 cm, 30-40 cm, 40-50 cm, 50-60 cm und 60-75 cm. Die Proben aus den verschiedenen Tiefen wurden in verschließbare Gefrierbeutel gegeben, auf Eis transportiert und bei -20°C zur späteren

Gesamtmetallanalyse eingefroren bzw. zur Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen sofort eingesetzt.

Die Auengley-Proben wurden im Uferbereich entnommen; auf dem Altindustriestandort wurde für die Probennahme gezielt eine vegetationsfreie Fläche ausgewählt, da diese eine besonders hohe Metall(oid)-Belastung vermuten ließ.

Je 5 g Boden aus den oben beschriebenen Tiefen wurden im Anaerobenzelt in 250 ml Schott-Flaschen eingewogen und mit autoklaviertem, O₂-freiem Aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt. Der Boden wurde durch Umschwenken suspendiert und die Flaschen mit Gummistopfen und Schott-Deckeln verschlossen. Nach Gastausch mit N₂ wurden die Flaschen bei 37°C unter leichtem Schütteln (150 rpm) inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate untersucht. Von jeder Bodentiefe wurden drei parallele Ansätze sowie eine zweifach autoklavierte Kontrolle angesetzt.

2.2.2.2 Entnahme und Inkubation von Fäzes-Proben

Um die Fähigkeit der Darm-Mikroflora zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten untersuchen zu können, wurden als Teilaspekt einer Probandenstudie, die in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Essen, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin (Prof. Dr. Rettenmeier) durchgeführt wurde, Humanfäzes-Proben von 14 Probanden untersucht. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt, und die Probanden gaben vor der Studie ihr Einverständnis, dass die von ihnen abgegebenen Fäzes-Proben zu experimentellen Zwecken verwendet werden.

Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf der Entstehung flüchtiger Bismut-Derivate, da zum einen die Fähigkeit der Bi-Transformation zu volatilen Derivaten durch Mikroorganismen bekannt ist und zum anderen niedrig dosiertes Bismut als nicht toxisch gilt. Die Probanden waren durchweg männlich, Mitteleuropäer und im Alter von 25-31 Jahren. Ihnen wurden 2 Tabletten verabreicht (De-Noltab® (Yamanouchi Europe B.V., The Netherlands)), die insgesamt 215 mg Bismut in Form von kolloidalem Bismut-Subcitrat (Colloidal Bismuth Subcitrate, CBS) enthielten. Vor und nach der Verabreichung dieser Tabletten gaben die Probanden bis zu 6 Fäzes-Proben (10-50 g) in vorab autoklavierten 300 ml Glasgefäßen ab. Diese wurden anschließend mit Butylstopfen gasdicht verschlossen und mit Helium gespült, um

eine anaerobe Atmosphäre herzustellen. Weiterhin wurde den Fäzes-Proben O₂-freier PBS-Puffer (1 ml/g Fäzes; 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,8 g/l Na₂PO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4) sterilfiltriert zugegeben.

Anschließend wurden die Proben bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde in regelmäßigen Abständen die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate und zusätzlich die Bildung von Methan-Gas verfolgt.

2.2.3 Anreicherung und Isolierung Metall(oid)-volatilisierender Prokaryonten

2.2.3.1 Verwendete Medien

Zur Anreicherung und Isolierung biomethylierender Bodenorganismen wurden folgende Medien verwendet:

Bodenextraktmedium:

Je 20 g Boden aus den Schichten 15-30, 30-40, 40-50, 50-60 und 60-75 cm der Probennahme wurden in einer 1 l Schott-Flasche eingewogen. Nach Zugabe von 10 g Hefeextrakt wurde mit vollentsalztem Wasser auf 1 l aufgefüllt und ca. 30 min gerührt. Die festen Bodenbestandteile wurden 45 min abzentrifugiert (5.000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Resazurin (v/v) versetzt und der pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf pH 7 eingestellt.

DSM 120: *Methanosarcina* Medium (www.dsmz.de)

K₂HPO₄ 0,348 g, KH₂PO₄ 0,227 g, NH₄Cl 0,5 g, MgSO₄ x 7 H₂O 0,5 g, CaCl₂ x 2 H₂O 0,25 g, NaCl 2,25 g, FeSO₄ x 7 H₂O 0,002 g, Vitaminlösung 10 ml (s.u.), Spurenelementlösung 1 ml (s.u.), Hefeextrakt 2 g, Casitone 2 g, Methanol 10 ml Resazurin 0,001 g, NaHCO₃ 0,85 g, L-Cysteine 0,3 g, Aqua bidest. auf 1.000 ml.

DSM 318 (modifiziert): *Methanosarcina* (BCYT) Medium (www.dsmz.de)

KH₂PO₄ 0,3 g, NaCl 0,6 g, MgCl₂ x 6 H₂O 0,1 g, CaCl₂ x 2 H₂O 0,05 g, Spurenelementlösung 10 ml (s.u.), Vitaminlösung 10 ml (s.u.), NH₄Cl 1,0 g, Na-Acetat 6,8 g, Resazurin 1,0 g, KHCO₃ 4,0 g, L-Cysteine 0,3 g, Na₂S x 9 H₂O 0,3 g, Aqua bidest. auf 1.000 ml.

LB-Medium (Luria-Bertoni-Medium):

10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden mit VE-Wasser auf 1.000 ml aufgefüllt und 20 min gerührt.

Spurenelementlösung:

HCl (25 %; 7,7 M) 10 ml, $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 1,5 g, ZnCl_2 70 mg, $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 100 mg, H_3BO_3 6 mg, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 190 mg, $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 24 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 36 mg, Aqua bidest. auf 1.000 ml.

Vitaminlösung:

Biotin 2 mg, Folsäure 2 mg, Pyridoxin-HCl 10 mg, Thiamin-HCl $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 5 mg, Riboflavin 5 mg, Nicotinsäure 5 mg, D-Ca Pantothenat 5 mg, Vitamin B12 0,1 mg, p-Aminobenzoessäure 5 mg, Liponsäure 5 mg, Aqua bidest. auf 1.000 ml.

978 ml des jeweiligen Mediums wurden 20 ml der Vitaminlösung und 1 ml der Spurenelementlösung zugegeben. Als Redox-Indikator wurde eine 0,1 %-ige Resazurin-Lösung (v/v; 1 ml/l) hinzugegeben. Das Medium wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt.

Die Medien wurden als Flüssigmedien oder zur Herstellung von Agar-Agar-Platten verwendet.

2.2.3.2 Herstellung von Agar-Agar-Platten zur Isolierung anaerober Prokaryonten aus Umweltproben

Koch'sches Plattengussverfahren

Dieses Verfahren wurde sowohl mit DSM 120-Medium als auch mit Bodenextraktmedium durchgeführt .

500 ml des jeweiligen Mediums wurden in 1 l Schott-Flaschen angesetzt und mit 0,5 ml Resazurin versetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 7 wurde unter Rühren bei 90°C 7,5 g Agar-Agar zugegeben. Die Flaschen wurden mit Gummistopfen und Schott-Deckeln verschlossen. Um eine anaerobe Atmosphäre zu gewährleisten,

wurde ein Gaswechsel mit N₂ vorgenommen. Anschließend wurde autoklaviert (40 min bei 121°C) und mit einer 1,5 %-igen L-Cystein-Lösung reduziert. Zur Anreicherung methanogener Organismen wurde einigen Platten 100 µg/ml Ampicillin zur Wachstumshemmung bacterialer Organismen zugegeben. Die Platten wurden im Anaerobenzelt bei ca. 40°C gegossen. Je 100 µl aus Verdünnungsreihen von Bodenaufschlämmungen verschiedener Tiefen (Herstellung s.u.) wurden in sterile Petrischalen pipettiert und mit ca. 20 ml Agar-Agar-Medium unter leichtem Schwenken vermischt. Anschließend wurden die Platten einige Stunden im Anaerobenzelt zum Aushärten und Trocknen stehen gelassen und in Anaerobentöpfen bei ca. 22°C bis zu 4 Wochen inkubiert.

Plattierung

Die Agar-Agar-Medien wurden auf gleiche Weise hergestellt wie im Koch'schen Plattengussverfahren. Jedoch wurden die Verdünnungen der Bodenaufschlämmungen auf die ausgehärteten Platten ausgespatelt. Das Ausplattieren, Trocknen und die Inkubation der Platten über bis zu 4 Wochen erfolgte bei ca. 22°C im Anaerobenzelt in Kunststoffbeutel oder Anaerobentöpfen, um die Platten vor Austrocknung zu schützen.

2.2.3.3 Herstellung von Verdünnungsreihen

Je 5 g Boden wurden in 15 ml O₂-freiem Aqua bidest. gelöst und in 250 ml Schott-Flaschen bei Raumtemperatur für 24 h inkubiert.

Mit einer Spritze wurde 1 ml dieser Aufschlämmungen entnommen und daraus im Anaerobenzelt mittels sterilem, O₂-freiem PBS-Puffer (8 g/l NaCl, 1,4 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l NaH₂PO₄, pH 7,2) eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 DNS-Extraktion aus Umweltproben und Reinkulturen

Zellen wurden aus 2 ml einer Reinkultur (10^8 Zellen/ml) oder aus Humanfäzes-Proben (0,1 g Fäzes suspendiert in 2 ml autoklaviertem, steril-filtrierte PBS-Puffer) abzentrifugiert (10 min bei $4.000 \times g$). Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das verwendete Reaktionsgefäß zu 2/3 mit Glasperlen (0,1 mm Durchmesser, Roth GmbH, Karlsruhe) und autoklaviertem Aqua bidest. aufgefüllt. Die Mischung aus Glasperlen und Zell-Pellet wurde 5 min bei 5.000 rpm im Bead Beater behandelt. Nach 20-minütigem Abzentrifugieren (ca. $21.000 \times g$) wurde der Überstand abgenommen und die DNS mittels eines Nukleinsäure-Extraktions-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.4.2 Amplifizierung des 16S rDNS-Gens mittels PCR

Die DNS-Synthese erfolgte durch eine thermostabile DNS-Polymerase (GoTaq-Polymerase, Promega). PCR-Amplifikationen wurden mit Template-Einsätzen zwischen 10 und 100 ng und 10-30 pmol jedes Primers in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 20-200 µM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase durchgeführt.

Um gezielt die 16S rDNS verschiedener Gruppen von Prokaryonten amplifizieren zu können und damit Einblick in die unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener Biozönosen zu erhalten, wurden Gruppen-spezifische Primer-Kombinationen für die Gesamt-Population der Prokaryonten, Bacteria, Archaea und Methanoarchaea eingesetzt (Tab. 4).

Tab. 4: Primer-Kombinationen für die Amplifikation der 16S rDNS der archaealen-, der methanoarchaealen-, der bacterialen- und der Gesamt-Population aus Reinkulturen und Humanfäzes-Proben.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	Annealing Temperatur (°C)	Spezifität	Literatur
Arch f364	CCT ACG GGR BGC AGC AGG	58	Archaea	Skillman et al., 2006
Arch r1386	GCG GTG TGT GCA AGG AGC			
21f	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	52	Archaea	De Long, 1992
958r	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T			
ARC-8F	TCC GGT TGA TCC TGC C	55	Archaea	Teske et al., 2002 Kane et al., 1993
1492r	GGC TAC CTT GTT ACG ACT T			
109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	52	Archaea	Banning et al., 2005
915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT			
Met 86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	58	Methanoarchaea	Wright et al., 2004
Met1340r	CGG TGT GTG CAA GGA G			
COM1	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	52	Gesamt-Population der Prokaryonten	Schwieger et al., 1998
COM2ph	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT			
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	46	Bacteria	Hicks et al., 1992 Kane et al., 1993
1492r	GGC TAC CTT GTT ACG ACT T			
593f	TAC TCC CCA GGC GGA GTA CTT	55	Boden-Isolat ASI-1	Meyer et al., 2007
499r	TCA GGA GTG AAA GGC TAC GGC			

2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNS (Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Abschätzung der Größe und Konzentration von PCR-Produkten sowie zur präparativen Gewinnung von DNS-Fragmenten genutzt. Gearbeitet wurde ausschließlich mit einer 1 %-igen Agarosekonzentration in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Die Probe wurde mit Loading-Buffer (8 % Vol. Saccharose, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (je nach Größe der Gelkammer 75 V bzw. 120 V). Zur Sichtbarmachung der DNS wurde dem Agarosegel Ethidiumbromidlösung in einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugegeben und das Gel in einem Gel-Dokumentations-Gerät bei 254 nm beleuchtet. Zur Abschätzung der Größe und Konzentration von DNS-Fragmenten diente ein DNS-Marker (Gene-Ruler™ 1kb, Fermentas). Die Ergebnisse wurden durch

Fotografieren der Gele im PC-gekoppelten Chemilumineszenz-Detektor dokumentiert.

2.2.4.4 Extraktion von dsDNS und ssDNS aus TAE-Agarosegelen

Zur Extraktion der DNS aus 1 %-igen TAE-Agarosegelen wurde das QIAEX-Gelextraktionskit nach Angaben des Herstellers (Qiagen) verwendet.

Durch 15-minütige Erwärmung der Gel-Fragmente im Wasserbad bei 50°C wurde die DNS aus der Agarose gelöst, unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Matrix gebunden, gereinigt und mittels Aqua bidest. in ein Volumen von 50 µl eluiert.

2.2.4.5 Populationsuntersuchungen mittels SSCP-Methodik (Lee et al., 1996)

Einzelstrang DNS-Moleküle bilden unter nicht-denaturierenden Bedingungen spezifische Konformationen, die durch die jeweilige Basenabfolge der Moleküle bestimmt sind. Diese Konformationen weisen verschiedene Laufverhalten innerhalb der Gel-Matrix auf und lassen sich daher durch Gelelektrophorese in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen auftrennen.

Daher ist die SSCP (single strand conformation polymorphism)-Methodik geeignet 16S rDNS-Fragmente, die die gleiche Länge, aber eine unterschiedliche Sequenz aufweisen, über PAGE aufzutrennen und so das Vorkommen der Fragmente in unterschiedlichen Umweltproben vergleichend zu untersuchen. Weiterhin ist es durch Sequenzierung der isolierten SSCP-Banden möglich, einzelne mikrobielle Vertreter dieser Biozönosen zu identifizieren.

Zunächst wurde die Ausgangs-DNS mit Gruppen-spezifischen (Nested PCR) oder mit universellen Primern (COM1 und COM2ph / Gesamt-Mikroflora) amplifiziert. Die Nested PCR-Produkte wurden anschließend mittels der universellen Primer COM1 und COM2ph reamplifiziert, um eine Nukleotid-Länge von ca. 400 Basenpaaren zu erhalten. Das daraus resultierende PCR-Produkt bzw. die direkt amplifizierten COM-Primer-Produkte wurden anschließend aufgereinigt (Purification Kit, Quiagen), einem Einzelstrang-Verdau mittels einer Lambda-Exonuklease (New England Biolabs GmbH, Frankfurt; je Einzelprobe: 4 µl Lambda-Exonuklease 10 x Puffer, 0,5 µl Lambda-Exonuklease, 5,5 µl Aqua bidest.; 37°C für 45 min) und ein zweites Mal

aufgereinigt (Mini-Elute PCR Purification Kit, Qiagen). Mit diesem Produkt wurde darauf folgend eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt, um später vergleichbare DNS-Mengen auf das SSCP-Gel auftragen zu können.

Zur Abschätzung der Konzentration und der Laufstrecke der DNS-Fragmente diene ein aus der 16S rDNS von Marker-Organismen (*Bacillus licheniformis*, DSM 13^T; *Rhizobium trifolii*, DSM 1980; *M. smithii*, DSM 2374; *Rhizobium radiobacter*, DSM 30150) hergestellter DNS-Marker.

Probenvorbereitung für die PAGE und Herstellung der SSCP-Gele

Vor jeder SSCP-Analyse wurden bis zu 8 µl des jeweiligen PCR- bzw. Verdau-Produktes für 3 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Unmittelbar vor dem SSCP-Lauf wurden die eingefrorenen Proben schnell aufgetaut und dann in einem 0,4 mm dicken Gel (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium) mit 1 x TAE-Lauf-Puffer über 20-26 h bei 350 V und 20°C aufgetrennt. Tab. 5 zeigt die Zusammensetzung der hier benutzten Polyacrylamidgele.

Tab. 5: Komponenten zur Herstellung eines SSCP-Gels.

Komponente	Menge
MDE Gel Solution (2 x)	12 ml
10 x TAE-Puffer	2,5 ml
VE-Wasser	14,7 ml
TEMED	10 µl
40 % APS	25 µl

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Gelfärbung erfolgte mit Hilfe der Silberfärbung. Zunächst wurde das Gel zur Fixierung für 10 min in 10 % Essigsäure gegeben und anschließend 3 mal für 5 min in Aqua bidest. gewaschen. Daraufhin wurde es für 30 min zur Färbung in eine Silbernitratlösung (0,5 g AgNO₃, 0,75 ml 37 % Formaldehydlösung, 500 ml Aqua bidest.) gelegt und anschließend kurz mit Aqua bidest. gespült. Zur Entwicklung wurde das Gel für 5-15 min in 1,5 % Natriumhydroxid, 0,01 % Natriumborhydrid und 0,05 % Formaldehyd gegeben. Daraufhin wurde das Gel in einer Entwicklerlösung (33,75 g Na₂CO₃, 1,2 ml 37 % Formaldehydlösung, 0,6 ml 0,2 % Na-Thiosulfat, 600

ml Aqua bidest.) entwickelt. Anschließend wurde das SSCP-Gel 24 h bei RT getrocknet.

Extraktion von ssDNS aus SSCP-Polyacrylamidgelen und Sequenzierung der 16S rDNS

Die jeweiligen Banden wurden mittels eines sterilen Skalpells aus dem getrockneten SSCP-Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 50 µl Crush and Soak Buffer (0,5 M Ammonium Acetat, 10 mM Magnesium Acetat, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS) für 3 Stunden bei 37°C und 800 rpm inkubiert. 40 µl dieser Probe wurden in einem frischen Reaktionsgefäß mit 80 µl Ethanol (96 %-ig) versetzt, vorsichtig gemischt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Zuletzt wurden die Proben bei 21.000 x g in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

Die aus den SSCP-Banden extrahierte 16S rDNS wurde anschließend amplifiziert, gereinigt und sequenziert. Die DNS-Sequenzierungen wurden am Universitätsklinikum Essen (Innere Klinik, Tumorforschung) mit einem A.L.F (Automated Laser Fluorescence) -Sequencer durchgeführt bzw. bei der Firma AGOWA (München) in Auftrag gegeben. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels des datenbankvergleichenden Online-Programmes BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.2.4.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist geeignet, spezifische DNS- bzw. RNS-Sequenzen in Umweltproben nachzuweisen und dient somit der Identifizierung von Mikroorganismen im natürlichen Habitat.

Sonden (sog. Konsensusoligonukleotide), die gegen die ribosomale RNS gerichtet sind, bieten den Vorteil hoher Sensitivität und erlauben die Detektion von Einzelzellen aufgrund der hohen Kopienzahl der rRNS in der Zelle. Je nach Wahl der Zielsequenz, gegen die die Sonde gerichtet ist (hoch konservierte oder weniger konservierte Sequenzbereiche des RNS-Moleküls), erfasst diese Technik

Organismen eines engeren oder weiteren Verwandtschaftskreises von Mikroorganismen.

Zur *in situ* Detektion und Quantifizierung von ASI-1 in den untersuchten Boden-Proben wurde eine Oligonukleotid-Sonde konstruiert, die spezifisch gegen die 16S rDNS von ASI-1 gerichtet ist. Hierzu wurde zunächst die 16S rDNS Sequenz von ASI-1 nach PCR-Amplifikation mit den Primern 5' AGAGTT TGATCCTGGCTCAG 3' (27f) und 5' GGCTACCTTGTTACGACTT 3' (1492r) und anschließender Sequenzierung mit den genannten Primern und den zusätzlichen Primern 5' TAC TCCCCAGGCGGAGTACTT 3' (593f) und 5' TCAGGAGTGAAAGGCTACGGC 3' (499r) bestimmt. Aus den Datenbanken des „Ribosomal Database Project“ (RDP) (Maidak et al, 1999) und „Blast“ (Altschul et al., 1997) wurden der 16S rDNS Sequenz von ASI-1 ähnliche Sequenzen exportiert und die Datenbank des ARB-Programmpaketes (Strunk et al.) mit diesen Daten aktualisiert. Dieses Programmpaket ermöglicht die Suche nach spezifischen Unitär- bzw. Konsensus-Antisense-Oligonukleotiden – je nach Wahl der gewünschten Zielorganismen – innerhalb eines großen Datensatzes von 16S rDNS Sequenzen. Hierzu wurden unter Verwendung des ARB internen Unterprogramms ARB EDIT die neu hinzugefügten Sequenzdaten aligniert und ein neuer Sequenzserver, der um die hinzugefügten Sequenzdaten erweitert wurde, erstellt. Mittels der Unterprogramme PROBE DESIGN und PROBE MATCH wurde eine stammspezifische Sonde für ASI-1 (CGly55) mit der Sequenz 5' AGTAAATCGCTCGACCTT 3' konstruiert. Kontroll-Hybridisierungs-Experimente mit Stämmen, die 2 Fehlpaarungen zur ASI-1 spezifischen Sonde CGly55 aufweisen, zeigten kein Hybridisierungssignal.

Zusätzlich wurden Sonden eingesetzt, die 16S rRNS Zielsequenzen aus der Domäne der Archaea (Arch915: 5' GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3') (Stahl et al., 1991) und der Domäne der Eubacteria (EUB388: 5' GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3') (Stahl et al., 1991) komplementär sind.

Um die Mikroorganismen von der Boden-Matrix zu lösen, wurden 6 g Boden in 50 ml sterilem Aqua bidest. gelöst und für 30 min geschüttelt (200 rpm). Daraufhin wurden die Proben zur Sedimentation der Boden-Partikel bei 4°C über Nacht gelagert und anschließend für 10 sek bei 2.000 x g abzentrifugiert. Abschließend wurde der

Überstand der Proben in Ethanol fixiert und auf Polycarbonatfiltern immobilisiert (Schleicher und Schuell, Dassel).

Zur Identifizierung der Organismen wurden 5 ng der entsprechenden, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Indocarbocyanin (Cy3)) markierten Sonden in Gegenwart der auf Polycarbonatfiltern immobilisierten Zellen für 4 h bei 48°C hybridisiert (Hybridisierungspuffer: 5 ml Formamid, 1,8 ml 5 M NaCl, 200 µl 1 M Tris, 10 µl 10 % SDS, 4 ml H₂O) und anschließend für 30 min bei 50°C gewaschen (Waschpuffer: 368 µl 5 M NaCl, 400 µl 0,5 M EDTA, 38,616 ml H₂O). Die durchgeführten Hybridisierungen erfolgten unter Berücksichtigung von Standard-Protokollen (Amann et al., 1990).

Die Detektion der Hybride erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) mittels einer Filterkombination zur Grün-Anregung, die den an die Sonden gebundenen Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin (Cy3) zur Rot-Fluoreszenz anregt. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden die Präparate in Vectashield als Antifading-Reagenz eingebettet. Zur Quantifizierung wurden 50 Felder eines Okular-Rasters (9,8 µm²) ausgezählt.

2.2.5 Analytische Methoden

2.2.5.1 PT-GC/ICP-MS Analytik

Die Analyse auf flüchtige Metall(oid)-Derivate erfolgte im Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen (Arbeitsgruppe Prof. Hirner) mittels einer modifizierten "Purge and Trap"-Gaschromatographie (PT-GC) und Massenspektrometrie mit Plasma-Anregung (ICP-MS) als elementspezifischen Detektor in Anlehnung an Wickenheiser et al. (1998). Bei der verwendeten "Purge and Trap"-Technik handelt es sich um eine schonende Separationstechnik, bei der die Analyten zunächst auf einem hydrophoben Trägermaterial bei tiefen Temperaturen (-196°C) angereichert werden und gaschromatographisch separiert werden.

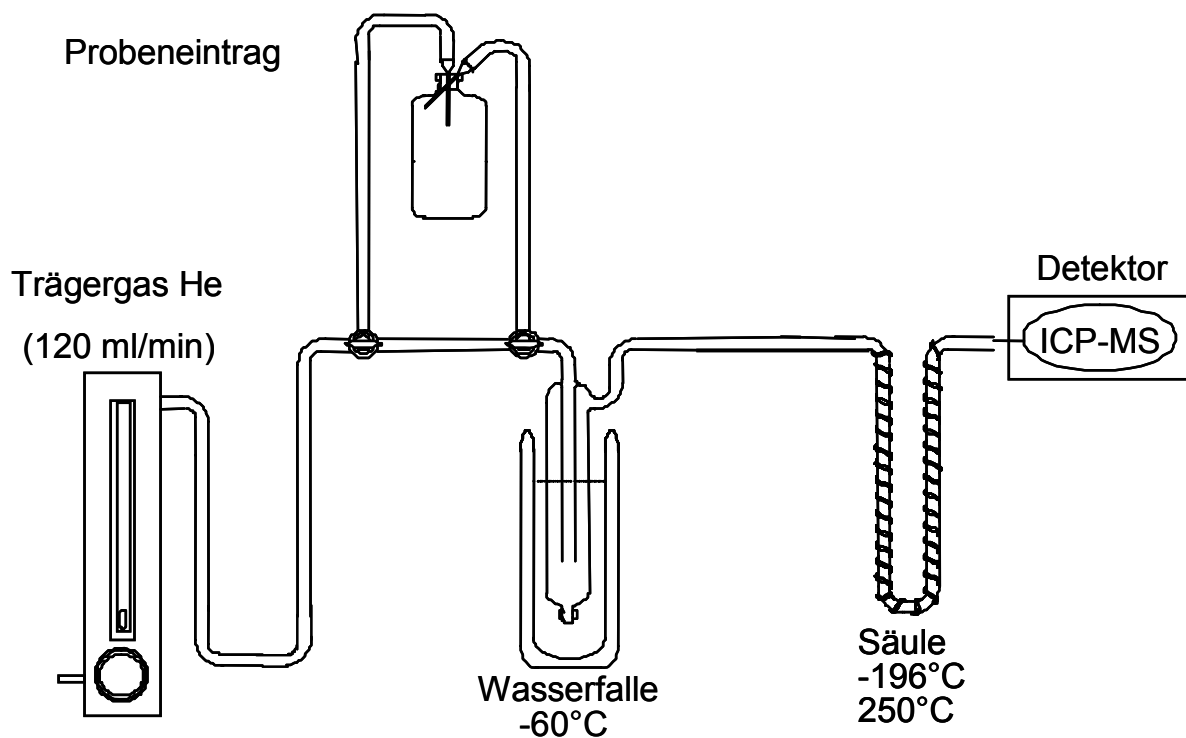


Abb. 1: Schematischer Aufbau der „Purge and Trap“-Analyseapparatur.

Im folgenden wird der Analyseablauf exemplarisch dargestellt: Durch Injektion einer Gasprobe mit einer gasdichten Glasspritze in eine leere Injektionsflasche wurden unter kontinuierlichem Helium-Gasstrom (120 ml/min) die flüchtigen Metall(oid)-Derivate für 3 min bei Raumtemperatur auf einer Chromatographie-Säule kryofokussiert (-196°C). Durch anschließendes Aufheizen der Chromatographie-Säule auf 250°C werden die Analyten nach ihren Siedepunkten getrennt und mittels beheizter Transferleitung (80°C) in das ICP-MS überführt.

Die durch die PT-GC-Apparatur nach Siedepunkten getrennten Analyten werden im bis zu 8.000 K heißen Argon-Plasma des ICP-MS, welches durch einen Radiofrequenzgenerator erzeugt wird, atomisiert und ionisiert, so dass die Analyten als Element-Ionen des entsprechenden Metall(oid)s vorliegen. Der Ionenstrom wird im Hochvakuum des Interface fokussiert und dem Quadrupol-MS zugeführt. Die Separation der im Plasma erzeugten Ionen erfolgt im Quadrupolfeld, welches durch vier quadratisch angeordnete Molybdänstäbe mit entgegengesetzt gerichteten Potenzialfeldern und überlagerter Wechselfeldspannung erzeugt wird. Nur Ionen mit definiertem m/z -Verhältnis bleiben bei gegebener Quadrupolspannung und Frequenz des Wechselfeldes auf einer stabilen Flugbahn, entsprechend der Gleichung:

$$\frac{m}{z} = 1,39 \times 10^7 \pm \frac{U_{max}}{(f^2 \times r_0^2)}$$

mit :

U_{max} = Quadrupolspannung

f = Frequenz des Quadrupolwechselfeldes

r_0 = Abstand zwischen den Quadrupolstäben

Alle anderen Ionen fliegen ungerichtet durch den Raum und werden nach Entladung an den Quadrupolstäben oder den Umwandlungen über die Hochvakuum pumpen aus dem System entfernt. Im sogenannten Massensprungsmodus werden nur diskrete m/z -Beträge angewählt, so dass die Impulse pro Isotop und Zeiteinheit detektiert werden. Als Detektor fungiert ein Sekundärelektronenvervielfacher, der den durch

Auftreffen der Ionen auf eine Photokathode erzeugten Strom über ein kontinuierliches Dynodenfeld verstärkt und das Signal der computergesteuerten Datenakquisition bereitstellt. Die Akquisition der Daten erfolgte mittels der vom Gerätehersteller mitgelieferten Software im zeitaufgelösten Modus (TRA=Time Resolved Analysis). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Microsoft Excel[®] und Microcal Origin[®] ausgewertet. Die Betriebsparameter des ICP-MS sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Betriebsparameter des ICP-MS.

RF-Generator Leistung:	1350 W
<u>Argon-Gasflüsse</u>	
Plasma:	1,1 l/min
Kühlung:	13 l/min
Zerstäuber:	0,8-1,3 l/min
	konzentrisch nach Meinhard
Sprühkammer:	nach Scott
Zerstäubereffizienz:	1,5–5 %
Fluss des ¹⁰³ Rh-Standards (selbstansaugend):	0,018-0,028 ml/sek
Basiswert des ¹⁰³ Rh-Standards (1 µg/l):	50.000-150.000 cps (relative Intensität)

Die Bestimmung der flüchtigen Metall(oid)-Derivate erfolgte durch Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation der chromatographischen Trennung in der PT-GC-Analyseapparatur und der Detektion des Masse-Ladungsverhältnisses des entsprechenden Metall(oid)s mittels ICP-MS (m/z 75 As, m/z 78 Se, m/z 120 Sn, m/z 121 Sb, m/z 126 Te, m/z 202 Hg, m/z 207 Pb, m/z 209 Bi). Die Quantifizierung der flüchtigen Metall(oid)-Derivate erfolgte durch externe Interelement-Kalibrierung zum Signal einer ¹⁰³Rh-Standardlösung (1 µg/l) in 1 % Salpetersäure, indem die Intensität der im ICP-MS detektierten Analyt-Ionen auf die Intensität der ¹⁰³Rh-Standardlösung bezogen wurde (Feldmann, 1997). Die Bestimmung des relativen Empfindlichkeitsfaktors eines Elements (RSF_a), also das Intensitätsverhältnis des Analyten-Signals in dem ICP-MS zur Intensität des Rhodium-Signals, wurde durch Vermessung einer Multielement-Standardlösung in 1 % (v/v) Salpetersäure nach folgender Formel bestimmt:

$$RSF_a = \frac{(I_a - I_{a0}) \cdot c_s}{(I_s - I_{s0}) \cdot c_a}$$

mit:

- RSF_a = relativer Standardfaktor des Analyten
 I_a = Intensität (Zählrate) des Analyten in der Multielement-Standardlösung
 I_{a0} = Intensität (Zählrate) des Analyten in der Spüllösung (1 % Salpetersäure)

 I_s = Intensität (Zählrate) des Standards (hier Rh) in der Multielement-Standardlösung
 I_{s0} = Intensität (Zählrate) des Standards (hier Rh) in der Spüllösung (1 % Salpetersäure)
 c_s, c_a = Konzentrationen des Standards bzw. des Analyten in der Multielement-Standardlösung

Die ^{103}Rh -Standardlösung und der Multielement-Standard wurde dem Argon-Plasma der ICP pneumatisch als feuchtes Aerosol zugeführt, welches durch Zerstäubung mittels eines Argon-Gasstromes erzeugt wurde. Durch die Zerstäubung gelangt nur ein Teil der Standardlösungen in das Plasma, so dass neben der Flussrate der zugeführten Standardlösung auch die Zerstäubereffizienz einen Einfluss auf die absolute Menge der dem Plasma pro Zeiteinheit zugeführten Rhodium-Ionen hat. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt durch Differenzwägungen der Standardlösung sowie des Ablaufs bei gegebener Analysedauer. Die Bestimmung des relativen Standardfaktors wird für jedes Element, welches für die Analyse von Interesse ist, bestimmt, da die Ionisierung, die Überführung in das Interface und die massenspektrometrische Detektion für jedes Element unterschiedlich ist.

Die absolute Menge des zugeführten Analyt-Ions (m_a) wird nach Integration des zeitabhängigen Messsignals der Intensitäten des Analyt- und des Standard-Ions nach Abzug der jeweiligen Grundintensitäten (Blindwerte) in den Integrationsgrenzen nach folgender Formel berechnet:

$$m_a = \int_{t_1}^{t_2} \frac{I_a}{I_s} \cdot \frac{v \cdot z}{RSF_a} \cdot dt$$

mit:

t	=	Zeit (s)
t_1, t_2	=	Integrationsflanken
I_a	=	Intensität des Analytensignals
I_s	=	Intensität des ^{103}Rh -Standardsignals
v	=	Fluss der ^{103}Rh -Standardlösung (ml/s)
z	=	Zerstäubereffizienz
RSF_a	=	Relativer Standardfaktor des Analyten zum Signal der ^{103}Rh -Standardlösung

Der Gesamtfehler der hier beschriebenen Interelement-Kalibrierung liegt im Bereich von $\pm 30 \%$ (Feldmann, 1997).

2.2.5.2 Bestimmung von Methan mittels Gaschromatographie

Die Methan-Produktion der verwendeten methanogenen Kulturen wurde mittels Gaschromatographie zur Bestimmung der physiologischen Aktivität der Probe-Kulturen detektiert. So wurden aus der Gasphase der jeweiligen Kulturen Volumina zwischen 100 und 500 μl mit einer gasdichten Spritze entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Die Ermittlung der Retentionszeit und die Quantifizierung erfolgte über einen Methan-Standard (50,3 % CH_4 in N_2). Die Betriebsparameter des Gaschromatographen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt:

Tab. 7: Betriebsparameter des GC.

<u>Gas-Flüsse:</u>	
Trägergas (He):	1,2 ml/min
Wasserstoff:	4,2 ml/min
Synthetische Luft:	315 ml/min
<u>Temperaturen:</u>	
Ofen:	100°C
Injektor:	100°C
Detektor:	100°C

2.2.5.3 Ansätze zur Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Reinkulturen

Reinkulturen von Eigen-Isolaten und Stämmen aus Stammsammlungen wurden in 120 ml Serum Flaschen anaerob mit dem entsprechenden Medium, der jeweiligen Gasphase und entsprechender Temperatur unter moderatem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Der Inkubator wurde zum Schutz vor Photolyse verdunkelt. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen der Salze einzelner Metall(oid)e (Endkonzentration: 1 μ M bis 1 mM) oder mehrerer Metall(oid)e (Endkonzentration: 1 μ M für jedes Metall(oid)-Salz) ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, SbCl_3 , SeO_2 , TeO_2 , HgCl_2 , KH_2AsO_4) versetzt. Anschließend wurde die Gasphase in regelmäßigen Abständen auf die Anwesenheit flüchtiger Metall(oid)-Derivate mittels PT-GC/ICP-MS untersucht. Bei methanoarchaealen Stämmen wurde zusätzlich die Methan-Produktion verfolgt.

2.2.5.4 In vitro Produktion von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Die Herstellung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus Rohextrakt von *Methanosarcina mazei*, Methylcobalamin, DTT, GSH, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ und HEPES-Puffer (Huber et al., unpublished). Dieses Gemisch wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Konzentrations-Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erfolgte mittels PT-GC/ICP-MS.

2.2.5.5 Gesamtmetallbestimmung der Boden-Proben mittels RFA

Ca. 20 g Boden aus den Tiefen 15-30, 30-40, 40-50, 50-60 und 60-75 cm wurden 48 h auf Trockenpapier getrocknet. Während der Trocknungszeit wurden die Proben regelmäßig zerrieben, um Klumpenbildung zu vermeiden. Die Proben wurden anschließend gesiebt (2,5 μ m Porengröße) und je ca. 5 g des erhaltenen Siebgutes in sterilen Petrischalen eingewogen.

Um die Korngröße weiter zu verringern, wurden die Proben in einer Schwingscheibenmühle (Fa. Herzog, Typ HSM100H) erneut verrieben. Anschließend wurden je 4 g der einzelnen Proben mit 0,9 g Wachs mit einem Mörser sorgfältig vermischt und mit einer Presse (Fa. Herzog, Typ HTP40) zu Messtabletten geformt.

Diese Tabletten wurden in den Probenhalter des RFA-Spektrometers eingegeben und auf ihren Metall(oid)-Gehalt, gemäß Schreiber et al. (1999), untersucht.

2.2.5.6 Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter Wasser-, Stickstoff-, Schwefel-, Gesamt-Kohlenstoff-Gehalt, organischer Anteil und pH-Wert

Bodenproben aus den verschiedenen Tiefen wurden in Porzellantiegeln eingewogen, bei 105°C ca. 24 h im Trockenschrank getrocknet und anschließend erneut gewogen. Aus der Differenz von Nass- und Trockengewicht ergibt sich der Wassergehalt der Proben. Zur Bestimmung des Glühverlustes wurden die Proben im Glühofen zwei Stunden bei 500°C geglüht und anschließend gewogen. Aus der Differenz des Gewichts vor und nach dem Glühen wurde der Gewichtsverlust, bzw. der organische Anteil der Bodenproben, berechnet.

Die Bestimmung des N- und C-Gehaltes erfolgte in der Abteilung für Bodenkunde der Universität Duisburg-Essen, Arbeitsgruppe Prof. Burkhardt. Je zwischen 6 und 13 mg der in der Schwingscheibenmühle fein vermahlenden Boden-Proben wurden in Zinkschatteln eingewogen; anschließend wurde eine Spatelspitze Vanadium(V)-Oxid als Katalysator zugesetzt. Die Zinkschatteln wurden sorgfältig verschlossen und in den Probenhalter eingegeben. Die Analyse wurde in einem Elementanalysator des Typs EA 3000 (HEKAtech GmbH, Wegberg) durchgeführt.

2.2.6 Statistik und Ergebnisdarstellung

Statistische Analysen und die Darstellung von Ergebnissen in Form von Tabellen und Abbildungen wurden mit Hilfe der Software-Programme Origin 5.0 und Microsoft Excel Version 6.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus einem Auengley und einem industriell überprägten Boden

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Böden handelt es sich um einen Auengley und einen industriell überprägten Boden.

Als Auengleye werden Böden von Flussniederungen bezeichnet, die periodisch von Hochwasser überflutet werden. Während der Überschwemmungen werden in diese Gebiete sowohl feste als auch gelöste organische und anorganische Stoffe eingetragen. Diese Böden sind daher im Allgemeinen sehr nährstoffreich und verfügen über eine vielfältige Mikroflora. Der hier untersuchte Auengley liegt im periodischen Überflutungsbereich der Ruhr in der Nähe von Essen-Werden und wird nicht landwirtschaftlich oder in einer anderen Form genutzt.

Der industriell überprägte Boden hingegen befindet sich auf einem ehemaligen Industriestandort in Gelsenkirchen. Die hier untersuchten Bereiche waren Bestandteil einer ehemaligen Chemiefabrik für Farben und Lacke, welche in den frühen 1970er Jahren aufgegeben und abgerissen wurde. Eine Verbreitung der Chemikalien fand horizontal im gesamten Boden statt. Die Fläche ist nur gering vegetationsbedeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus Boden-Proben-Aufschlammungen des Auengleys und des Industrie-Bodens mittels PT-GC/ICP-MS untersucht.

Die Proben der untersuchten Böden wurden zunächst durch die allgemeinen Bodenparameter charakterisiert und auf ihren Gesamtmetall(oid)-Gehalt untersucht. Ferner wurde versucht, Mikroorganismen aus den Boden-Proben unter anaeroben Bedingungen zu isolieren und auf ihr Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten zu prüfen.

3.1.1 Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter

Zur allgemeinen Charakterisierung der untersuchten Boden-Proben wurden die Parameter Wasser-, Stickstoff-, Schwefel-, Gesamt-Kohlenstoff-Gehalt, organischer Anteil und pH-Wert bestimmt (Tab. 8). Der pH-Wert liegt für den Altindustriestandort im neutralen Bereich, der Auengley weist einen leicht sauren pH auf. Der Auengley bietet mit mäßig bis stark humosen Bedingungen, hohem Wassergehalt und hohem Stickstoffgehalt für Mikroorganismen wesentlich förderlichere Wachstumsbedingungen als der Industrie-Boden. Insbesondere der vergleichsweise hohe organische Anteil lässt ein hohes Nährstoffangebot vermuten.

Für den Industrie-Boden konnte der organische Anteil aufgrund seiner extrem hohen Carbonat-Gehalte nicht bestimmt werden, da die enthaltenen Carbonate bei der Veraschung der Proben ebenso wie die Humusbestandteile gasförmig entweichen und so den organischen Anteil verfälschen. Beim Auengley traten nur geringe Carbonat-Gehalte auf; daher war der Fehler in der Berechnung des organischen Anteils vernachlässigbar gering.

Tab. 8: Bestimmung der allgemeinen Bodenparameter von Auengley und Industrie-Boden aus Tiefen von 15-75 cm.

Bodentiefe	Wasser- Gehalt (%)	Stickstoff- Gehalt (%)	Gesamt- Kohlenstoff-Gehalt (%)	Schwefel- Gehalt (%)	pH-Wert	Org. Anteil [%]
	A / I	A / I	A / I	A / I	A / I	A / I
15-30 cm	28,4 / 11,8	0,17 / 0,004	2,6 / n.b.	0,016 / n.b.	6,5 / 7,3	5,1 (stark humos) / n.b.
30-40 cm	24,0 / 14,7	0,2 / 0,024	3,2 / n.b.	0,025 / n.b.	6,7 / 7,2	3,4 (mäßig humos) / n.b.
40-50 cm	35,3 / 17,8	0,18 / 0,003	3,7 / n.b.	0,021 / n.b.	6,4 / 7,4	6,3 (stark humos) / n.b.
50-60 cm	25,8 / 34,3	0,14 / 0,0	2,4 / n.b.	0,015 / n.b.	6,1 / 7,2	3,72 (mäßig humos) / n.b.
60-75 cm	32,5 / 16,6	0,3 / 0,009	5,6 / n.b.	0,056 / n.b.	6,1 / 7,1	5,91 (stark humos) / n.b.

A, Auengley; I, Industrie-Boden; n.b., nicht bestimmt

3.1.2 Ergebnisse der Gesamtmetallbestimmung durch RFA

Für Quecksilber-, Blei- und Arsen-Gehalte in Böden liegen nach der Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BbodSchV, 1999) Prüfwerte für Kinderspielflächen, Wohngebiete, Park- und Freizeitanlagen, Ackerbau, Nutzgärten und Industrie- und Gewerbegrundstücke vor. In Tab. 9 sind die Wertebereiche der Prüfwerte angegeben, wobei die niedrigsten Werte für Kinderspielflächen, Wohngebiete und landwirtschaftlich genutzte Flächen und die höchsten für Industrie- und Gewerbegrundstücke gelten. Bei Überschreitung von Prüfwerten wird im Einzelfall entschieden, ob Maßnahmen in Form von Absperrungen oder Sanierungen der belasteten Fläche vorzunehmen sind. Ob solche Maßnahmen wirklich vorgenommen werden, hängt im Einzelfall jedoch von der beabsichtigten Nutzung der betroffenen Fläche ab. Liegt keine Nutzung vor bzw. ist keine Nutzung angedacht, reicht es meist aus die Fläche für die Öffentlichkeit unzugänglich zu machen.

Die Ergebnisse der Gesamtmetallbestimmung (Tab. 9) zeigten, dass es sich bei dem beprobten Auenboden um einen nur mäßig belasteten Boden und bei dem vorliegenden Industrie-Boden um einen sehr hoch belasteten Boden handelt.

Tab. 9: Metall(oid)-Gehalte der untersuchten Böden im Vergleich zu Prüfwerten laut Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BbodSchV, 1999).

Bodentiefe (cm)	Metall(oid)-Konzentration (mg/kg Trockengewicht)							
	Arsen A / I	Bismut A / I	Antimon A / I	Selen A / I	Zinn A / I	Tellur A / I	Blei A / I	Quecksilber A / I
15-30	6,9 / 617	0,6 / 22	1,4 / 52	DL / 4	5,3 / 32	0,7 / 1,5	55,2 / 1170	n.b. / 36
30-40	7,5 / 145	1,3 / 3	1,1 / 15	DL / 7	5,8 / 12	DL / 1,2	61,9 / 350	n.b. / 7
40-50	7,3 / 33	1 / 1	DL / 8	DL / 9	4,1 / 9	DL / 2,1	60,8 / 392	n.b. / 28
50-60	8,5 / 70	1 / 2	1,5 / 19	DL / 1	5,3 / 5	0,2 / 1,5	77,3 / 277	n.b. / 7
60-75	14,3 / n.b.	1,6 / n.b.	1,2 / n.b.	DL / n.b.	9,8 / n.b.	0,3 / n.b.	144,6 / n.b.	n.b. / n.b.
Prüfwerte für Böden (mg/kg Trockengewicht)	25-200	*	*	*	*	*	0,1-2.000	2-80

n.b., nicht bestimmt; DL, unter Detektions-Limit

*, keine Grenzwerte vorhanden

A, Auengley; I, Industrie-Boden

Der Industrie-Boden überschreitet für die Metall(oid)e Arsen, Blei und Quecksilber in allen Bodentiefen die angegebenen Untergrenzen der Prüfwerte. Insbesondere in der

Tiefe von 15-30 cm liegen die Metall(oid)-Konzentrationen sehr hoch, Arsen sogar über der hier angegebenen Höchstgrenze des Prüfwertes. Eine Nutzung dieser Fläche wäre nur durch eine vorhergehende Bodensanierung möglich.

Die Metall(oid)-Gehalte des Auengleys liegen für Arsen unter den Prüfwerten. Nur der Blei-Gehalt liegt in allen Bodentiefen über der Untergrenze des Prüfwertes. In der Tiefe von 60-75 cm sind die höchsten Metall(oid)-Gehalte zu finden.

Da für die Metall(oid)e Bismut, Antimon, Selen, Zinn und Tellur keine Prüfwerte existieren, kann lediglich festgestellt werden, dass der Industrie-Boden im Vergleich zum Auengley wesentlich höhere Metall(oid)-Konzentrationen aufweist.

3.1.3 Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in aufgeschlammten Boden-Proben

Die Transformation von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Derivaten durch Mikroorganismen ist ein wichtiger Prozess im biochemischen Kreislauf von Metallen wie Bi, Hg, Sn, Pb oder Metalloiden wie As, Sb, Se und Te, insbesondere da die Mobilität dieser Derivate höher ist als die der anorganischen Edukte.

Auch wenn die Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten in der Umwelt schon beschrieben wurde, ist wenig über die für die Produktion solcher Verbindungen in Böden und Sedimenten verantwortliche Mikroflora bekannt.

Um das mikrobielle Potenzial zur Verflüchtigung von Metall(oid)en in schwach belasteten bis stark kontaminierten Böden zu untersuchen, wurden Proben aus einem Auengley und einem Industrie-Boden aus verschiedenen Tiefen anaerob inkubiert und die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate über die Dauer der Inkubation verfolgt. Um auf Anwesenheit von Methanoarchaea in den Boden-Proben zu prüfen, wurde die Bildung von CH₄ durch die inkubierten Proben untersucht. Jedoch konnte für keine der hier untersuchten Boden-Proben die Produktion von CH₄ nachgewiesen werden.

Zudem wurden verschiedene Stämme aus Boden-Proben isoliert, um ihr individuelles Transformations-Potenzial zu untersuchen.

Standard-Methodik für die Identifizierung und Quantifizierung der gebildeten flüchtigen Metall(oid)-Derivate war die PT-GC/ICP-MS Analytik. Ein für die PT-GC/ICP-MS typisches Chromatogramm flüchtiger Arsen-Derivate ist in Abb. 2 dargestellt.

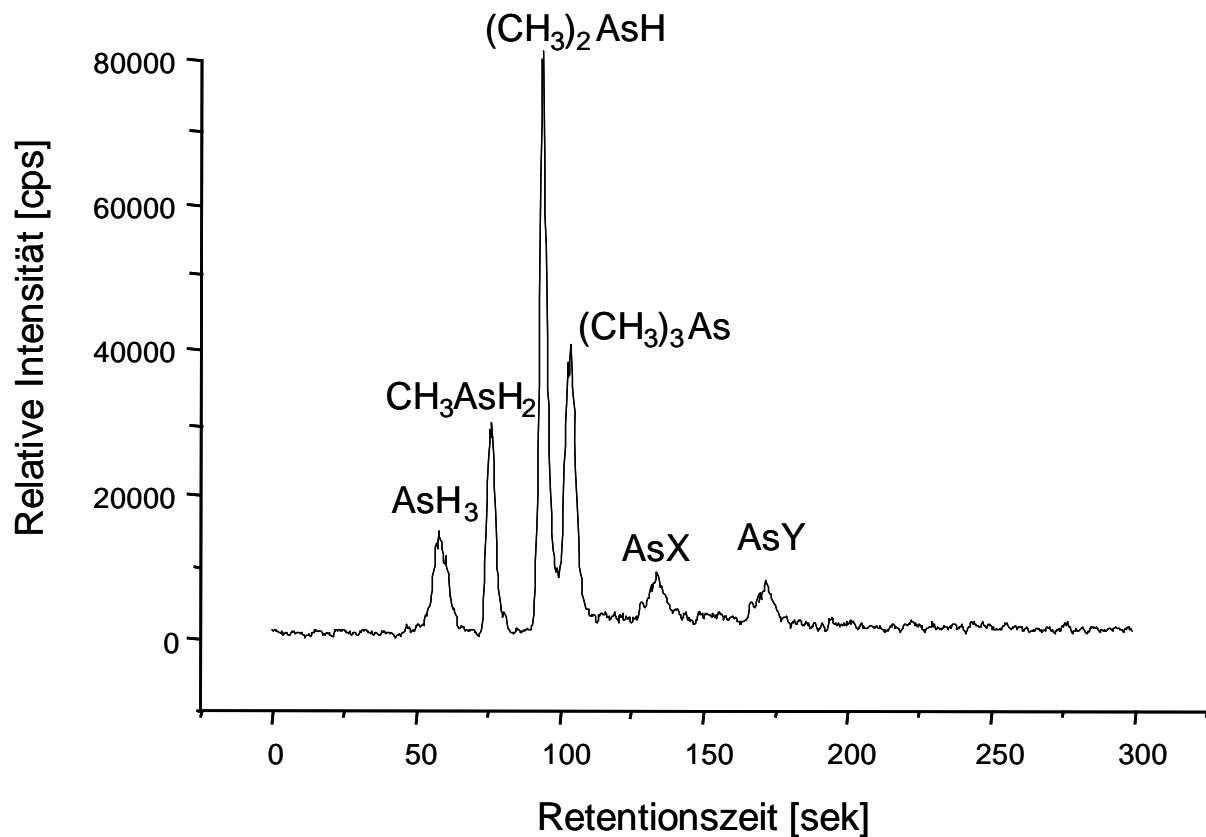


Abb. 2: Typisches Chromatogramm der PT-GC/ICP-MS Analyse flüchtiger Arsen-Derivate in der Gasphase einer inkubierten Boden-Probe des Auengleys aus einer Tiefe von 30-40 cm.

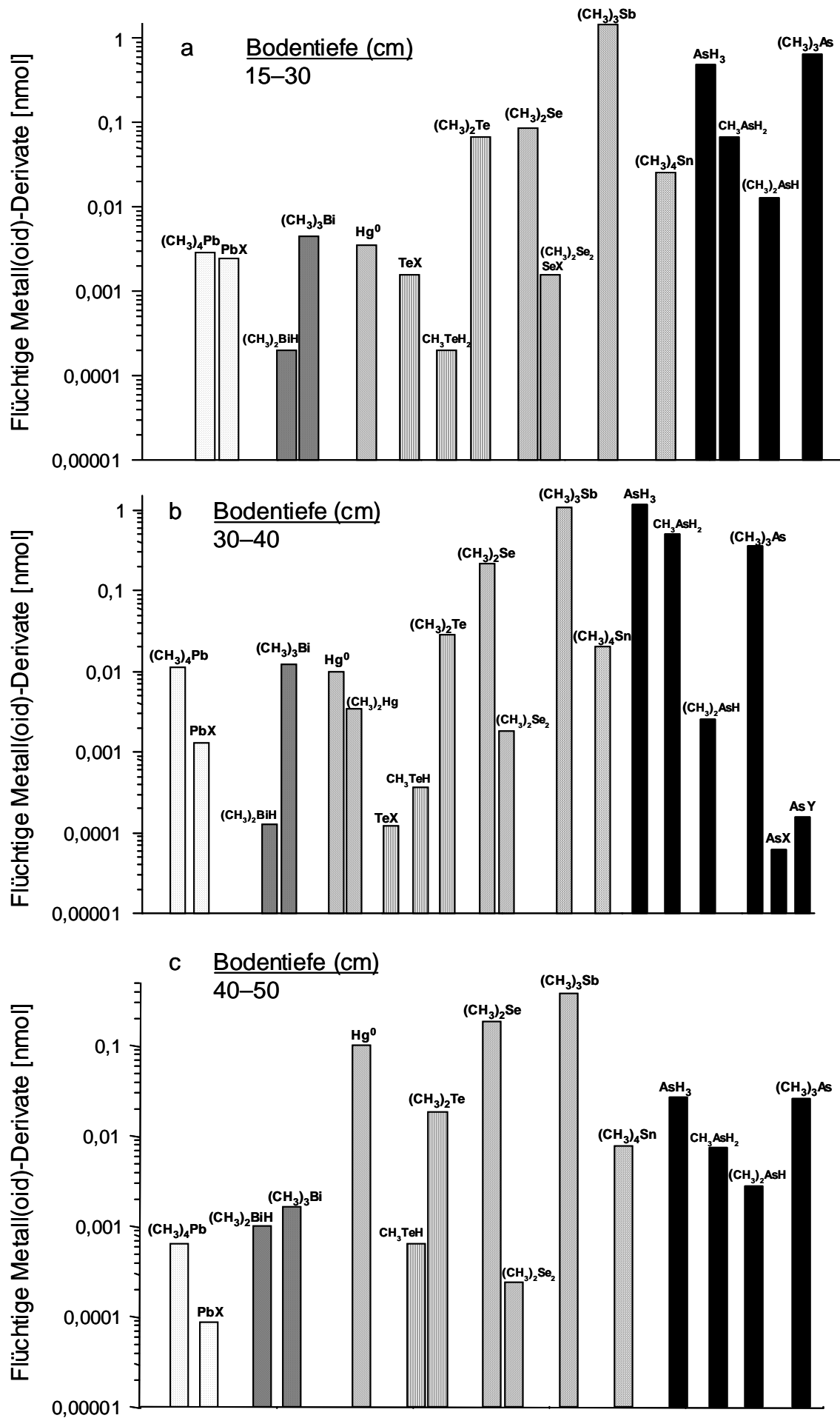
Während einer Inkubationsdauer von bis zu 4 Monaten unter Helium-Atmosphäre konnte in den aufgeschlammten Auenboden-Proben aus Tiefen von 15 bis 75 cm ein breites Spektrum an flüchtigen Metall(oid)-Derivaten in der Gasphase der Proben detektiert werden. In der Gasphase der aufgeschlammten Proben der Industriebrache konnten dagegen ausschließlich flüchtige Selen-Verbindungen detektiert werden (Tab. 10). Diese können allerdings nicht eindeutig auf eine physiologisch aktive Mikroflora zurückgeführt werden, da flüchtige Selen-Verbindungen auch in Steril-Kontrollen nachgewiesen wurden.

Tab. 10: Flüchtige Metall(oid)-Derivate in der Gasphase anaerob inkubierter Proben des Auengleys und des Industrie-Bodens aus einer Bodentiefe von 15–75 cm.

Metall(oid)e	<u>Flüchtige Metall(oid)-Derivate*</u>		
	Auengley	Industrie-Boden	Steril-Kontrollen (Auengley, Industrie-Boden)
As	AsH ₃ , CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As, AsX, AsY	DL	DL
Bi	(CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	DL	DL
Sb	(CH ₃) ₃ Sb	DL	DL
Se	CH ₃ SeH ₂ , (CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX, SeY	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂
Sn	(CH ₃) ₃ Sn	DL	DL
Te	TeX, CH ₃ TeH, (CH ₃) ₂ Te	DL	DL
Pb	(CH ₃) ₄ Pb, PbX	DL	DL
Hg	Hg ⁰ , (CH ₃) ₂ Hg	DL	DL

*Nachgewiesene flüchtige Metall(oid)-Derivate über eine anaerobe Inkubationsdauer von bis zu 4 Monaten; DL, unter Detektions-Limit

Die Produktion der flüchtigen Metall(oid)-Derivate der inkubierten Auengley-Proben (Tab. 10) konnte der physiologisch aktiven Mikroflora zugeordnet werden. So wurden in autoklavierten Kontrollen von Proben, mit Ausnahme von Spuren-Konzentrationen flüchtiger Selen-Verbindungen, keine flüchtigen Metall(oid)e festgestellt. Die Produktion flüchtiger Selen-Derivate in Gegenwart von Mikroorganismen war um ein Vielfaches höher als die in den Steril-Kontrollen nachgewiesenen Konzentrationen. In allen hier untersuchten Bodentiefen (15-75 cm) konnten neben den permethylierten Metall(oid)-Derivaten von As ((CH₃)₃As), Bi ((CH₃)₃Bi), Sb ((CH₃)₃Sb), Te ((CH₃)₂Te), Sn ((CH₃)₃Sn) und Pb ((CH₃)₄Pb) auch Hydride bzw. teilmethylierte Hydride von Arsen (AsH₃, CH₃AsH₂, (CH₃)₂AsH), Bismut ((CH₃)₂BiH) und Tellur (TeH₃, CH₃TeH) nachgewiesen werden. Außerdem wurde elementares Quecksilber gefunden. Die methylierte Quecksilber-Verbindung (CH₃)₂Hg wurde nur in einer Tiefe von 30-40 cm detektiert. Zusätzlich zu den bekannten volatilen Metall(oid)-Spezies wurden 2 Arsen-, 2 Selen- und 1 Tellur-Spezies detektiert, deren chemische Struktur bis jetzt nicht geklärt ist und die im Weiteren als flüchtige Verbindungen AsX, AsY, SeX, SeY und TeX geführt werden. Die dominanten flüchtigen Verbindungen waren in allen hier inkubierten Bodentiefen (CH₃)₃Sb, (CH₃)₂Se, AsH₃, CH₃AsH₂, (CH₃)₃As und (CH₃)₂Te (Abb. 3 a-e).



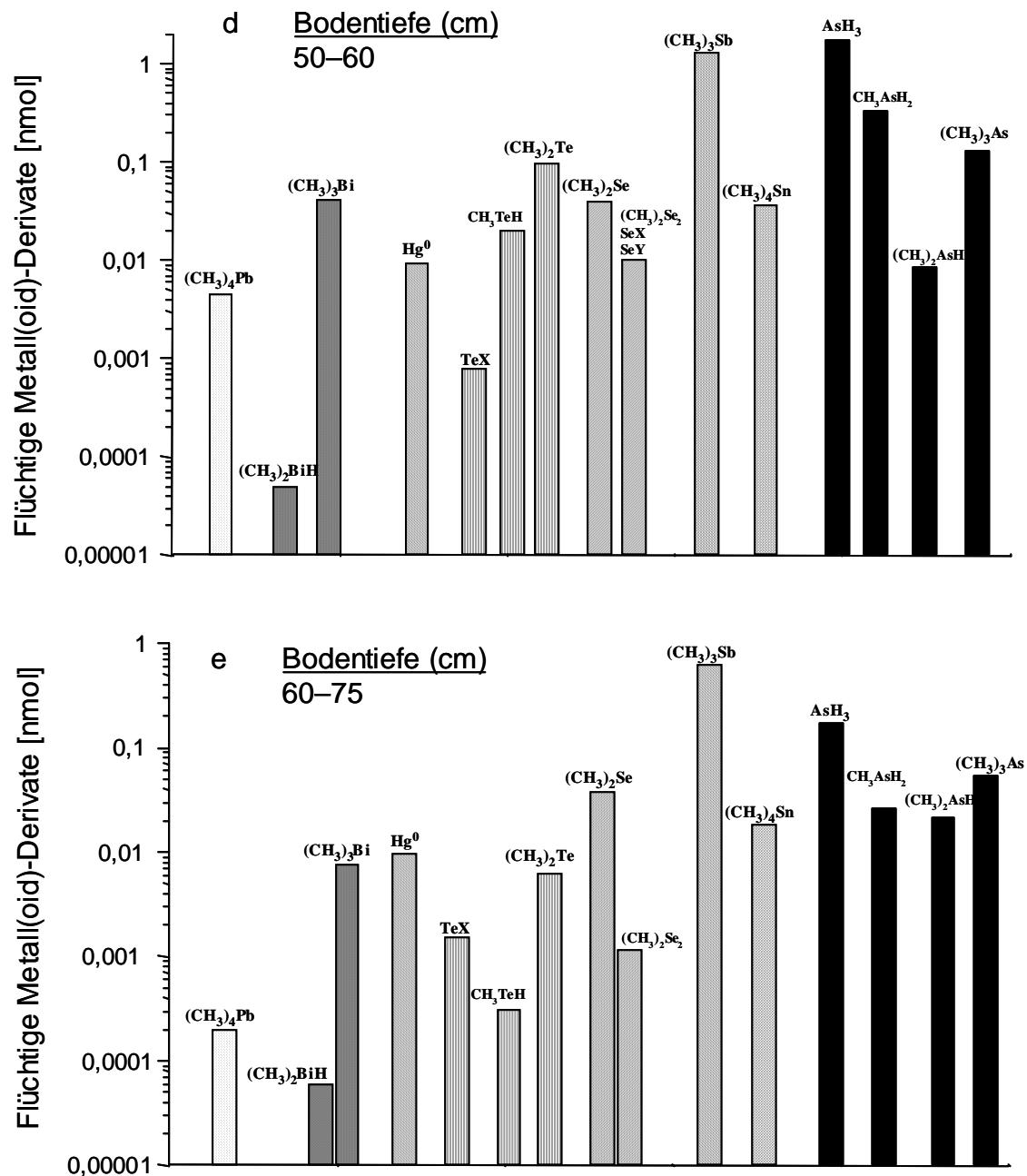


Abb. 3 a-e: Produzierte flüchtige Metall(oid)-Derivate in anaerob inkubierten Auengley-Proben verschiedener Bodentiefen.

Interessanterweise unterschieden sich die Produktions-Kinetiken der flüchtigen Spezies der verschiedenen Elemente stark. So begann die Produktion flüchtiger Selen-Verbindungen in allen hier untersuchten Proben direkt nach Beginn der anaeroben Inkubation der Boden-Proben und endete 14 Tage später, wohingegen die Synthese von Arsen- und Antimon-Verbindungen erst begann als die der Selen-Verbindungen schon im Abnehmen begriffen waren, wie für eine inkubierte Auengley-Probe der Tiefe 30-40 cm beispielhaft in Abb. 4 dargestellt.

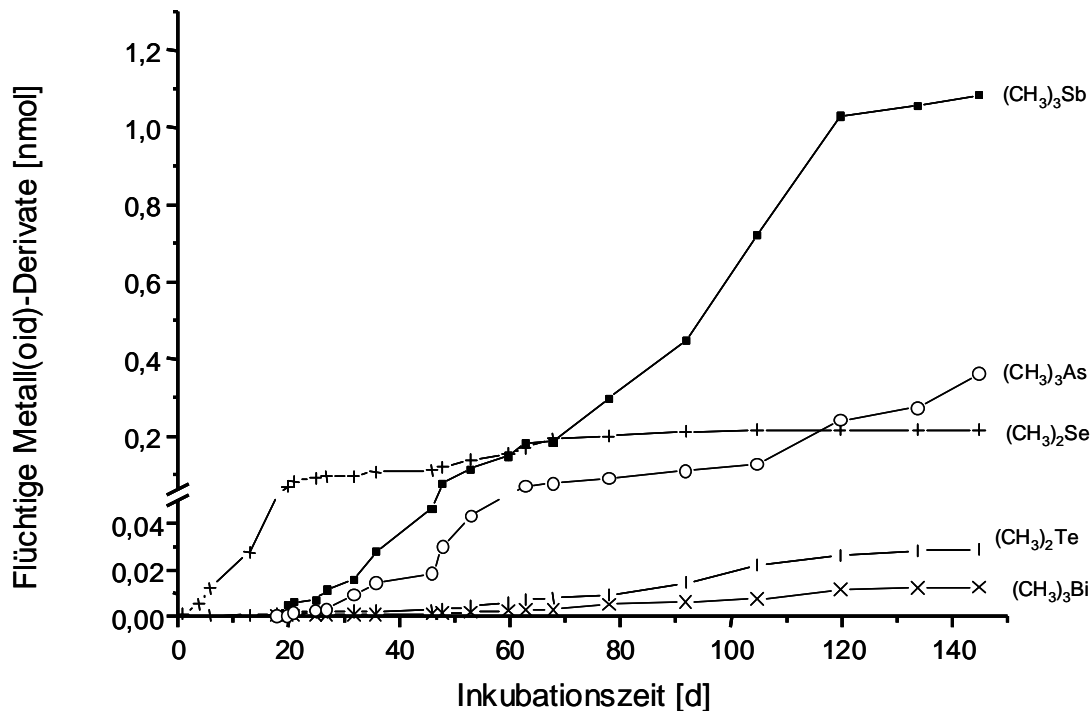


Abb. 4: Beispielhafter Zeitverlauf der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate einer anaerob inkubierten Auengley-Probe der Tiefe 30-40 cm über einen Zeitraum von ca. 4 Monaten.

3.1.4 Fähigkeit von anaerob kultivierten Boden-Isolaten zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten

Um Einblicke in die Mikroorganismengemeinschaft zu bekommen, die für die Produktion der flüchtigen Metall(oid)-Derivate verantwortlich ist, wurden klassische Plattierungstechniken durchgeführt, über die die Isolierung von 10 Boden-Isolaten (ASI-1; BodEx 1 bis 8; SPArch) gelang. SPArch konnte über Epifluoreszenz-Mikroskopie und über den Nachweis von CH₄ als ein Vertreter der Methanoarchaea identifiziert werden.

Das höchste Transformations-Potenzial zeigte sich in Gegenwart eines Gemisches der Metall(oid)-Salze KH₂AsO₄, SbCl₃, HgCl₂, Bi(NO₃)₃, TeO₂, SeO₂ und SnCl₂ (Endkonzentration: 1 µM für jedes Metall(oid)-Salz) für das Boden-Isolat ASI-1, die anderen Boden-Isolate wiesen ein weitaus engeres Spektrum an flüchtigen Derivaten auf (Tab. 11). So fanden sich in der Gasphase der anderen Boden-Isolate keine flüchtigen Tellur-Derivate und kein methyliertes Quecksilber. Auch die Anzahl der flüchtigen Derivate für die einzelnen Elemente (z.B. Selen und Arsen) war geringer als für ASI-1. Für das methanogene Boden-Isolat SPArch konnte keine

Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten nachgewiesen werden; zudem konnte eine Hemmung des Wachstums SPArch schon in Gegenwart geringer Metall(oid)-Konzentrationen beobachtet werden.

ASI-1 hingegen volatilisierte alle in den Inkubationsversuchen zugegebenen Metalle und Metalloide zu einem oder mehreren flüchtigen Derivaten. Zudem konnten 3 unbekannte flüchtige Metall(oid)-Derivate, AsX, SeX und SeY in der Gasphase von ASI-1 Kulturen detektiert werden. Interessanterweise produzierte ASI-1 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ nur in Gegenwart der Metalloide As und Sb, was auf eine Kreuzinduktion schließen lässt, d.h. auf eine durch die Elemente As und Sb induzierte Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$.

Tab. 11: Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate von Boden-Isolaten, die aus Auengley Boden-Proben der Tiefe 15-75 cm stammen.

Metall(oid)	Boden-Isolate									
	Stamm ASI-1	BodEx1	BodEx2	BodEx3	BodEx4	BodEx5	BodEx6	BodEx7	BodEx8	SPArch
As	AsH_3 , CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$, AsX	DL	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$	CH_3AsH_2	CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_3\text{As}$	CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_3\text{As}$	$(\text{CH}_3)_3\text{As}$	CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_3\text{As}$	CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$	DL
Sb	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	DL	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	DL	DL	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	DL	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	DL
Se	CH_3SeH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, $(\text{CH}_3)_2\text{SeS}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$, SeX, SeY	DL	DL	SeH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	DL	DL	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	SeH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	DL
Te	TeH_3 , CH_3TeH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
Bi	DL	$(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	DL	DL	$(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	DL	DL	$(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	$(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	DL
Bi (in Gegenwart von As, Sb)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
Hg	Hg^0 , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL

DL, unter Detektions-Limit

Das Spektrum der von ASI-1 produzierten flüchtigen Metall(oid)-Derivate glich im Gegensatz zu den Spektren der Boden-Isolate BodEx 1 bis 8 und SPArch sehr stark dem des Auengleys. Daraus könnte man schließen, dass ASI-1 eine dominante Rolle in der Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten in dem vorliegenden Auengley einnimmt.

3.1.5 Charakterisierung von ASI-1: Phylogenetische und physiologische Eigenschaften, Metall(oid)-Derivatisierung sowie Abundanz im Auengley

ASI-1 ist ein strikt anaerobes, Gram-positives Stäbchen (2 bis 5 μm Länge; 0,3 bis 0,5 μm Breite), das entweder einzeln oder in Ketten von 2-5 Zellen wächst (Abb. 5).

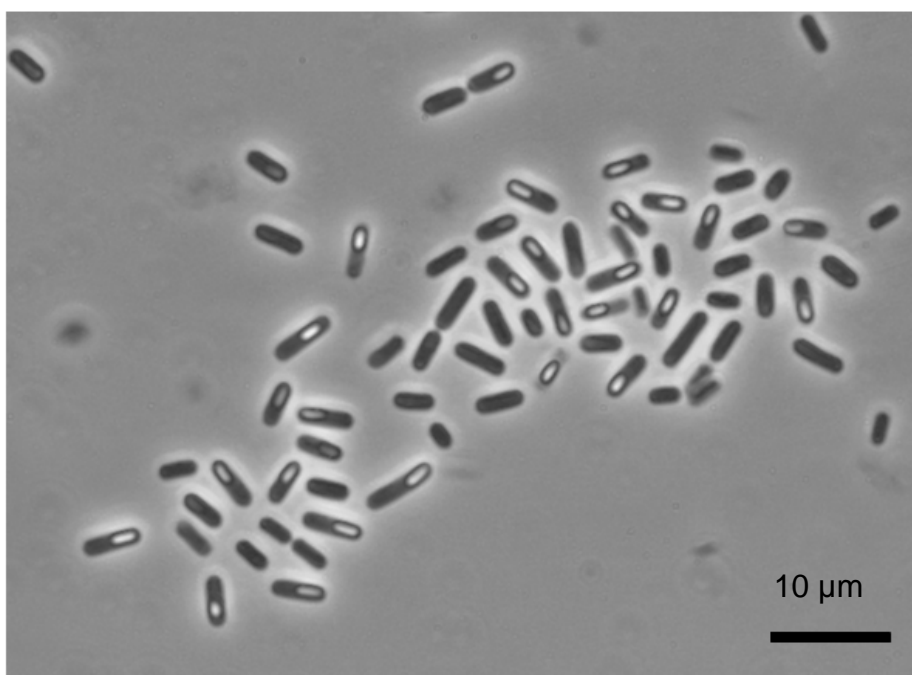


Abb. 5: Phasenkontrast-Aufnahme von ASI-1 (Vergrößerung 1250 x).

ASI-1 bildet klar sichtbare Endosporen aus, die subterminal bis terminal positioniert sind. Kolonien auf Agar-Agar-Platten erscheinen milchig und flach ausgeprägt. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C.

3.1.5.1 Phylogenetische Position und taxonomische Zuordnung von ASI-1

Abb. 6 zeigt die 1358 Basenpaare lange Nukleotid-Sequenz der 16S rDNS von ASI-1, welche über die DDBJ/EMBL/GenBank Datenbank unter der Accession Number DQ133569 hinterlegt wurde. Das 16S rDNS-Gen wurde mittels der Primer-Kombinationen 27f/1492r und 593f/499r amplifiziert und sequenziert.

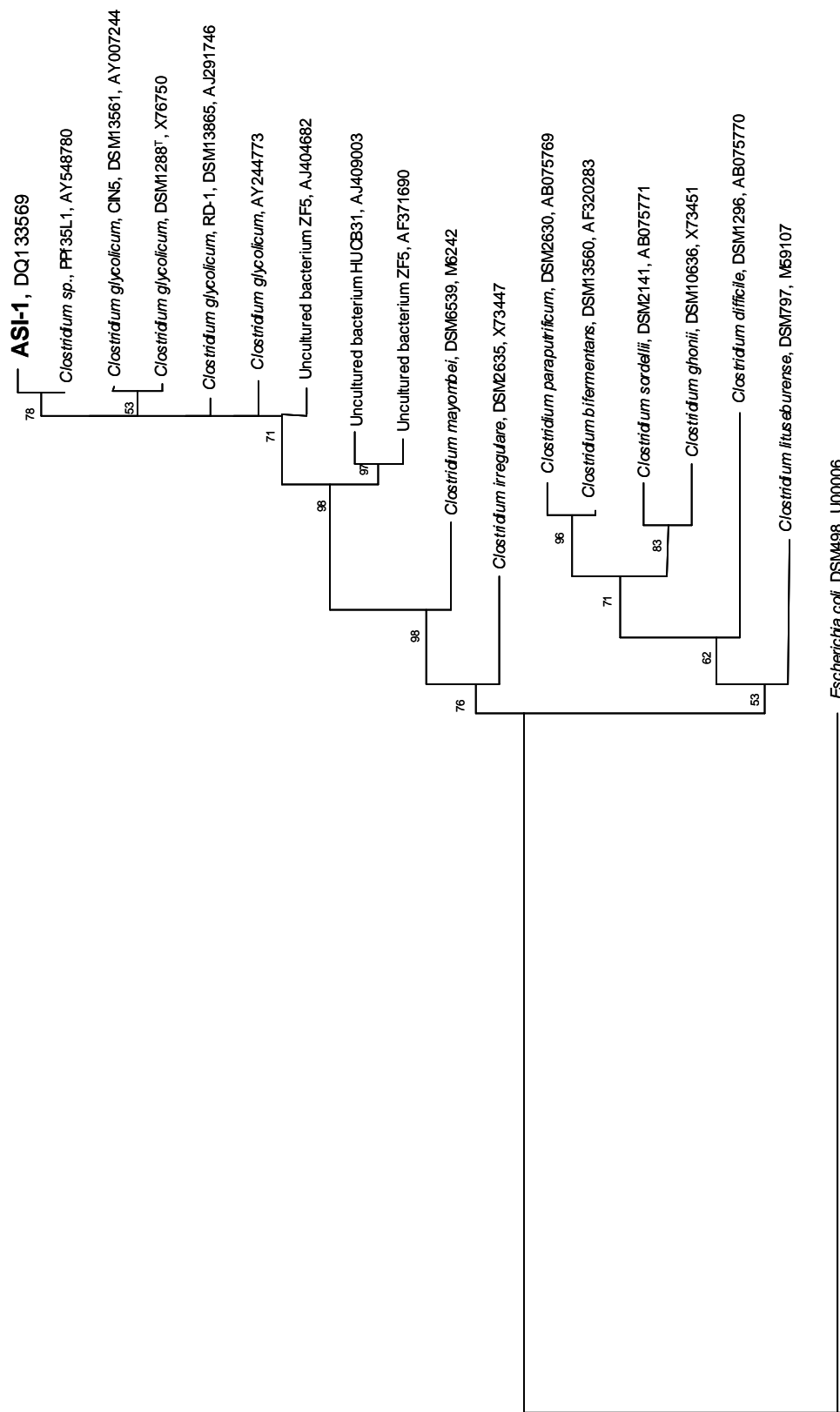
```

GGGTTAGCTAAGTGGCTTCGGGCGCCCCCAACTTCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGA
CCCGGGAACGCATTACCGCAGCATTCTGATCTGCGATTACTAGTAACTCCAGCTTCATGTAGGC
GAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGGGATTAGCTCGGCCTCACGACTTGGC
TGCCCTCTGTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAGCATAAGGGGCATGATGATTTGAC
GTCATCCCCACCTTCTCCAGGTTATCCCTGGCAGTCCCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGC
AACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAACCATGCACCACCTGTCACTTCTGTCCCCGAAGGGAAAAATGCGATTAGGCATCGGTCAAAA
GGATGTCAAGCTTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCGCTACTTGT
GCGGGTCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTCCCCAGGCGGAGTACTTAA
TGC GTTAGCTGCGGCACCGAGGGGGGTAACCCCCGACACCTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTTACAGTCCA
GAAAGCCGCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTC
CACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTTCAAGAGCTTACTACGGTTGAGCCGTAGCCTTT
CACTCCTGACTTAAAAAACCACTACGCACCTTTACGCCAGTAAATCCGGATAACGCTAGCCC
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTCCTCAAGTACCGTCATTA
TCTTCTTGAGGACAGAGTTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGCATCA
GGCTTTCGCCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGACCGTGTCTCAG
TTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACTGATCGTCGCCTTGTAAGCCATTACCTT
ACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCTCATACCGCCGGAGCTTTGATAAGAAATCCATGTG
AATCTCTTATATTATCCTGTATTAGCATACCTTTCGGTATGTTATCCATGTGTATGAGGCAGGTTAC
CCACGCGTACTCACCCGTCCGCCGCTCTTTACCGAAGTAAATCGCTCGACCTTGCAT

```

Abb. 6: 16S rDNS Sequenz des Boden-Isolats ASI-1.

Phylogenetische Analysen der Sequenzdaten ergaben, dass ASI-1 dem *Clostridium* Cluster XI (Collins et al., 1994) innerhalb des Nieder-G+C Zweiges der Gram-positiven Bacteria zuzuordnen ist. Sequenz-Vergleiche, basierend auf der „maximum likelihood distance matrix analysis“ ergaben die höchste Verwandtschaft zu dem unkultivierten Organismus *Clostridium spec.* PPf35L1 (Accession Number AY548780 (Kaksonen et al., 2004); 99,54 % Sequenz-Ähnlichkeit) gefolgt von den *C. glycolicum*-Stämmen DSM 13865 (99,52 %), DSM 13561 (99,0 %), und DSM 1288^T (98,8 %) (Abb. 7).



0.1

Abb. 7: Phylogenetischer Baum von Isolat ASI-1 auf der Grundlage von 16S rDNS Sequenz-Vergleichen. Dargestellt sind Artnamen, Stammbezeichnungen und Accession Number der Sequenz.

3.1.5.2 Physiologische Eigenschaften von ASI-1

Tab. 12 zeigt auf welchen Substraten Wachstum von ASI-1 im Vergleich zu nah verwandten *Clostridium glycolicum*-Stämmen möglich ist.

Tab. 12: Physiologische Eigenschaften von ASI-1 im Vergleich zu nah verwandten *C. glycolicum*-Stämmen.

Eigenschaften	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 13561 (Chamka et al., 2002)	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 13865 (Küsel et al., 2002)	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 1288 ^T (Gaston et al., 1963)	Stamm ASI-1
Nitrat reduziert zu Nitrit	-	-	n.a.	-
<u>H₂S-Produktion aus:</u>				
Sulfat	-	-	n.a.	-
Schwefel	-	n.a.	n.a.	-
Thiosulfat	-	n.a.	n.a.	-
Sulfit	-	n.a.	n.a.	-
<u>Verwertung von Kohlenstoff-Verbindungen:</u>				
Ethylen Glykol	+	+	n.a.	-
Propylen Glykol	+	+	+	-
Ethanol	+	-	n.a.	-
Methanol	n.a.	-	n.a.	-
Propanol	n.a.	-	-	-
Butandiol	n.a.	-	-	-
Glycerin	+	n.a.	-	+
Fructose	+	+	+	-
Galactose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	+
Ribose	-	n.a.	n.a.	+
Cellobiose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	+
Saccharose	-	-	-	+
Trehalose	-	n.a.	-	-
Xylose	+	+	+	-
Stärke	-	n.a.	-	+
Dulcitol	+	n.a.	+	-
Mannitol	-	n.a.	-	-
Sorbitol	+	n.a.	+	+
Acetat	n.a.	-	-	-
Zimtsäure	+	n.a.	n.a.	-
Lactat	-	+	n.a.	-
Hefeextrakt	+	+	+	+

n.a., nicht analysiert

ASI-1 wächst fermentativ in Abhängigkeit von 1 % Hefeextrakt und nutzt die organischen Verbindungen Glukose, Maltose, Saccharose, Mannose, Ribose, Sorbitol, Glycerin und Stärke. Hauptprodukte des fermentativen Wachstums sind Butanol und Buttersäure (GC-MS Messungen, Kösters et al., 2005; Kooperation mit Jan Kösters, Institut für Umweltanalytik, Universität Duisburg-Essen).

Derivate des Glykols können im Gegensatz zu den anderen *C. glycolicum*-Stämmen von ASI-1 nicht genutzt werden.

Weiterhin konnte keine Bildung von Sulfid in der Gegenwart von Schwefel-Verbindungen und keine Reduktion von Nitrat zu Nitrit beobachtet werden.

3.1.5.3 Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten durch anaerob inkubierte ASI-1 Kulturen

Wie in Tab. 11 zu sehen ist, besitzt ASI-1 ein sehr breites Volatilisierungsspektrum. Es ähnelt sehr stark dem Spektrum, das nach Inkubation von Auengley-Proben nachgewiesen wurde. Auffällig ist, dass die in Auengley-Inkubationen dominant auftretenden Metall(oid)-Derivate $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, AsH_3 , CH_3AsH_2 und $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ auch in den ASI-1-Inkubationsversuchen in hoher Konzentration nachgewiesen wurden (Abb. 8).

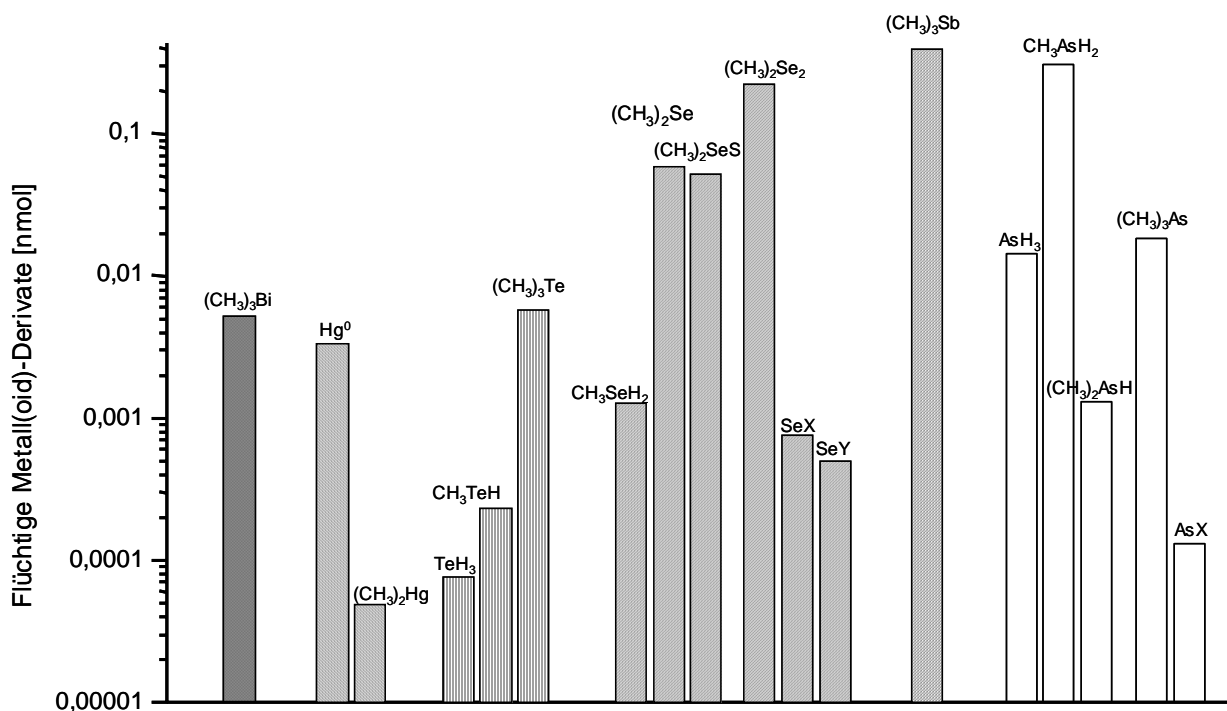


Abb. 8: Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten in anaerob inkubierten ASI-1 Kulturen in Gegenwart eines 1 μM Metall(oid)-Gemisches.

Bemerkenswert ist allerdings, dass ASI-1 im Vergleich zum Auengley mehr flüchtige Selen-Derivate produziert, und dass mit $(\text{CH}_3)_2\text{SeS}$ und $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ zwei weitere Selen-Verbindungen dominant auftreten. Zudem konnte in den Inkubationsversuchen mit ASI-1 im Gegensatz zu den Auengley-Inkubationen mit $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ eine methylierte Quecksilber-Verbindung nachgewiesen werden.

Produktion von flüchtigen Arsen-Derivaten durch Reinkulturen von ASI-1

ASI-1 Kulturen, die über mehrere Generationen in Gegenwart von Arsen gezogen wurden, wiesen eine höhere Produktion an flüchtigen Arsen-Derivaten auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Versuche mit Arsenat-adaptierten (d.h. über mehrere Generationen in Gegenwart von Arsenat kultivierten) und nicht-adaptierten (vor diesem Versuch ohne Arsenat kultivierten) ASI-1 Kulturen in Gegenwart von 1 μM , 100 μM und 1 mM Arsenat durchgeführt. Parallel wurden Kontroll-Kulturen (ohne Arsenat) auf die Bildung flüchtiger Arsen-Derivate untersucht. Alle Versuche wurden in 3 parallelen Ansätzen durchgeführt.

Wie in Abb. 9 zu sehen, konnten in der Gasphase Arsen-adaptierter ASI-1 Kulturen höhere Konzentrationen an flüchtigen Arsen-Derivaten detektiert werden als in Kulturen, die nicht an Arsenat adaptiert waren.

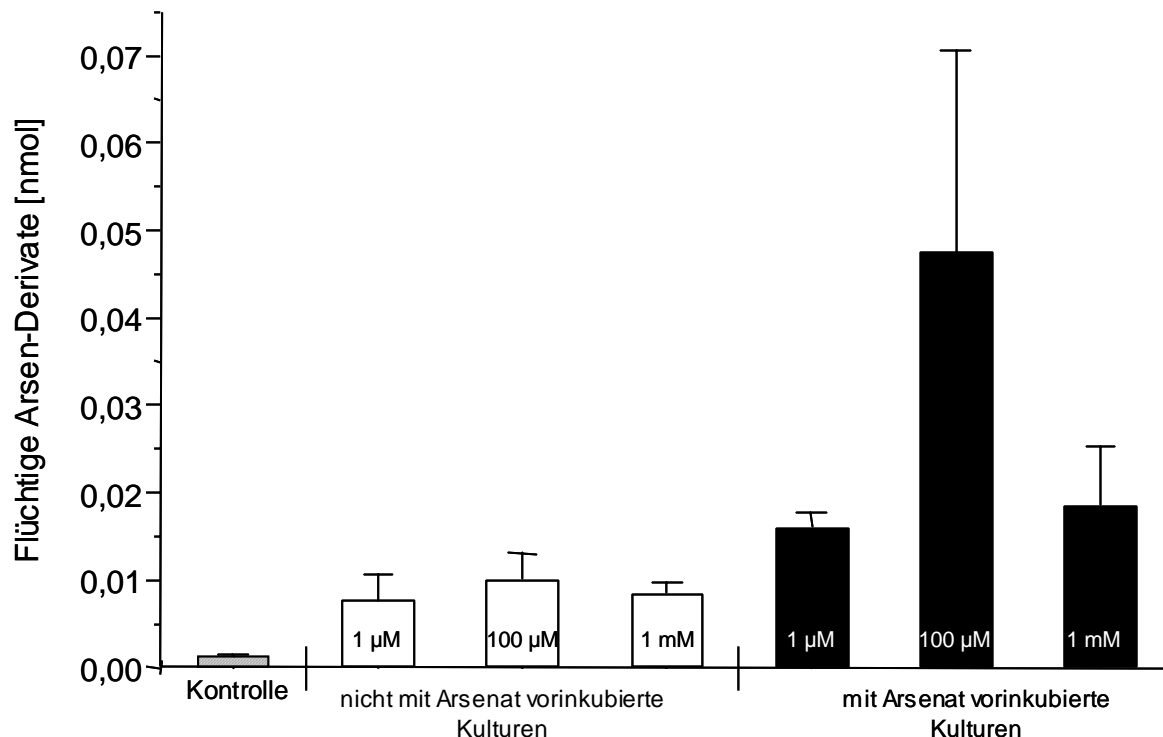


Abb. 9: Produktion flüchtiger Arsen-Derivate durch Arsen-adaptierte (schwarz) und nicht-adaptierte (weiß) ASI-1 Kulturen.

Auffällig war außerdem, dass auch in den 3 Kontroll-Kulturen, denen kein zusätzliches Arsenat zugegeben wurde, eine deutliche Produktion von flüchtigen Arsen-Derivaten nachgewiesen werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass bereits Arsen-Verunreinigungen aus dem Medium für die entsprechenden Umsetzungen ausreichen. Offensichtlich handelt es sich bei der Volatilisierung von Arsen um einen Prozess, der schon bei geringsten As-Konzentrationen abläuft.

Vergleich der Fähigkeit zur Metall(oid)-Transformation von ASI-1 und weiteren *C. glycolicum*-Stämmen

Um zu ermitteln, ob die Synthese flüchtiger Metall(oid)-Derivate eine generelle Fähigkeit von *C. glycolicum*-Stämmen darstellt oder ob es sich hier um eine spezifische Anpassung des Isolates an das Habitat handelt, wurden Inkubations-Versuche mit den *C. glycolicum*-Stämmen DSM 13561 und 1288^T durchgeführt. Wie aus Tab. 13 ersichtlich ist, produzierten die *C. glycolicum*-Stämme eine deutlich geringere Anzahl flüchtiger Metall(oid)-Derivate im Vergleich zu ASI-1. So konnten für diese Stämme lediglich flüchtige Selen- und Tellur-Derivate detektiert werden.

Tab. 13: Vergleich der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Kulturen von ASI-1 und zwei *C. glycolicum*-Stämmen.

Metall(oid)	Stamm ASI-1	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 13561	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 1288 ^T
As	AsH ₃ , CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As, AsX	DL	DL
Sb	(CH ₃) ₃ Sb	DL	DL
Se	CH ₃ SeH ₂ , (CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX, SeY	CH ₃ SeH ₂ , (CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	CH ₃ SeH ₂ , (CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂
Te	TeH ₃ , CH ₃ TeH, (CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₂ Te
Bi	DL	DL	DL
Bi (in Gegenwart von As oder Sb)	(CH ₃) ₃ Bi	DL	DL
Hg	Hg ⁰ , (CH ₃) ₂ Hg	DL	DL

DL, unter Detektions-Limit

3.1.5.4 Abundanz von ASI-1 im Auengley

Um Aufschluß über die Abundanz von ASI-1 in seinem Ursprungs-Habitat, dem Auengley, zu erhalten, wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) mit einer eigens konstruierten, gegen die 16S rDNS von ASI-1 gerichteten Oligonukleotid-Sonde an Auengley-Proben durchgeführt. Diese Sonde (CGly55) zeigte das stärkste Hybridisierungs-Signal bei einer Formamid-Konzentration von 40 %. Bei diesen Bedingungen wurden keine Fehlhybridisierungen mit den in Tab. 14 aufgeführten Organismen festgestellt.

Tab. 14: Ziel-Sequenzen für die Sonde CGly55 mit bis zu 2 Fehlpaarungen - ermittelt mit dem ARB software package (Strunk et al, 1999).

- GCAAGGTCGAGCGATTTACT	- ASI-1
- GCAA-GTTGAGCGATTTACT	- <i>Clostridium difficile</i> ; ATCC 9689; AB075770; DSM 1296
- GCAA-GTCGAGCGGATTTACT	- <i>Paenibacillus graminis</i> ; RSA19; AJ223987; DSM 15220
- GCAA-GTCGAGCGATTCACT	- <i>Clostridium glycolicum</i> ; X76750; DSM 1288 ^T
- GCAA-GTCGAGCGATTCACT	- <i>Clostridium glycolicum</i> ; CIN5; AY007244; DSM 13561

Um die Gesamtkeimzahl der Boden-Proben zu bestimmen, wurde aufgrund störender Hintergrund-Fluoreszenz nicht die sonst übliche DAPI-Färbung eingesetzt, sondern die spezifischen Hybridisierungs-Sonden für Archaea (Arch915) und Eubacteria (EUB388), deren Hybridisierungs-Signale in der Auswertung summiert wurden.

Die Auszählung der Sonden-markierten Zellen ergab Zellzahlen von $4 \times 10^3 \pm 8,3 \times 10^2$ pro g Boden (Trockengewicht); demgegenüber wurden durchschnittlich $2 \times 10^5 \pm 6,2 \times 10^4$ Zellen/g Boden (Trockengewicht) für die Gesamtkeimzahl bestimmt. Abb. 10 zeigt eine Fluoreszenz- (a) und eine DAPI-Aufnahme (b) von ASI-1.

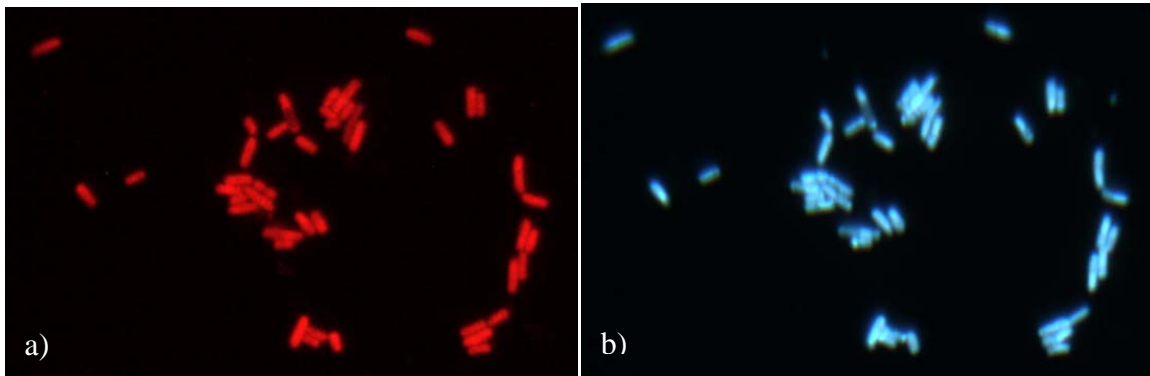


Abb. 10 a-b: Digitale Epifluoreszenz-Aufnahme von ASI-1 Zellen nach FISH mit der Sonde CGly55 (a) und DAPI-Färbung (b).

Um den Verlust an Zellen zu erfassen, der während der Versuchsdurchführung, insbesondere während der Abtrennung der Boden-Partikel, z.B. durch Adsorptionseffekte auftritt, wurde eine definierte Anzahl von ASI-1 Zellen zu Boden-Proben hinzugegeben und die Wiederfindungsrate über FISH bestimmt.

Diese Experimente ergaben, dass nur 3-5 % der applizierten ASI-1 Zellen wiedergefunden werden konnten. Unter Berücksichtigung dieser Zell-Verluste bei der Bestimmung der Keimzahlen ergibt sich für ASI-1 eine *in situ* Zellzahl von 9×10^4 Zellen/g Boden und für die Gesamtkeimzahl eine *in situ* Zellzahl von 5×10^6 Zellen/g Boden. Damit liegt der Anteil von ASI-1 an der Gesamt-Mikroflora des Auengleys bei ca. 2 %.

3.2 Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes-Proben

Motiviert durch Erkenntnisse vorhergehender Studien, die darauf hinwiesen, dass die Transformation von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Derivaten bevorzugt in anaeroben Habitaten stattfindet, und in Anbetracht der erhöhten Toxizität dieser Derivate wurde die Biotransformation der menschlichen Darm-Mikroflora untersucht, um das gesundheitsgefährdende Potenzial dieser Prozesse abzuschätzen. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen eine Probandenstudie durchgeführt, die Aufschluss über die Bioderivatisierung von Metall(oid)en im menschlichen Darm geben sollte.

Der Fokus dieser Studie wurde auf die Volatilisierung von Bismut gelegt, da das methylierte Derivat $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ eines der vorherrschend auftretenden flüchtigen Metall(oid)-Derivate ist, wie in einer Reihe von Untersuchungen mit bacterialen und methanoarchaealen Organismen anaerober Habitate gezeigt wurde (Michalke et al., 2000, 2002, 2007). Außerdem wird durch die Verwendung von Bismut in industriellen Produkten wie z.B. Pharmazeutika oder Kosmetika die Möglichkeit der Anreicherung von Bismut im menschlichen Körper und somit das Risiko der Entstehung flüchtiger Bismut-Derivate im menschlichen Darm erhöht. Als sehr leistungsfähig in der Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten zeigten sich in den genannten Untersuchungen insbesondere Vertreter der Methanoarchaea.

Im Rahmen dieser Studie wurde 14 gesunden, männlichen Probanden im Alter zwischen 25-31 Jahren 215 mg CBS (Kolloidales Bismut Subcitrat) (De-Noltab® (Yamanouchi Europe B.V., The Netherlands)) verabreicht. Sowohl vor als auch nach Zugabe von CBS wurden Fäzes-Proben der jeweiligen Probanden unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bis zu 4 Wochen inkubiert und die Bildung flüchtiger Bismut-Derivate verfolgt. Parallel wurden CH_4 -Messungen durchgeführt, um zu prüfen inwieweit Zusammenhänge zwischen der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate und der CH_4 -Produktion bestehen.

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Annette Schmidt, Dipl. Biol. Britta Huber, Dr. rer. nat. Klaus Michalke (Mikrobiologie I) und Dr. rer. nat. Margareta Sulkowski (Institut für Umweltanalytik) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt (Michalke et al., in Vorbereitung).

3.2.1 Produktion flüchtiger Bismut-Derivate durch anaerob inkubierte Fäzes-Proben in Abhängigkeit von der Bismut-Konzentration

Ziel dieser Untersuchungen war es zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen der in den Fäzes-Proben vorliegenden Bismut-Konzentration und der Produktion flüchtiger Bismut-Derivate vorliegt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Gesamtmetallanalysen der untersuchten Fäzes-Proben durchgeführt. Wie aus Tabelle 15 zu erkennen, steigt die Bismut-Konzentration im Fäzes der Probanden von 1,5 µmol/kg vor der CBS-Einnahme auf ca. 14.000 µmol/kg nach Einnahme. Die Konzentrationen der anderen Metall(oid)e lagen entweder unter dem Detektions-Limit der hier angewandten Analytik (Se, Te, Sn, Hg) oder wiesen vor und nach Zugabe von CBS keine signifikanten Unterschiede auf (As, Sb, Pb).

Tab. 15: Metall(oid)-Gehalte der untersuchten Humanfäzes-Proben (n = 64) vor und nach Zugabe von CBS.

<u>Metall(oid)</u>	<u>Konzentration (µmol/kg TG)</u>	
	Vor Zugabe von CBS	Nach Zugabe von CBS
	Mittelwert (Wertebereich)	Mittelwert (Wertebereich)
Arsen	1,5 (0,3 – 4,2)	1,3 (0,2 – 4,1)
Bismut	0,2 (DL – 2)	13.717 (1.420 – 60.693)
Antimon	0,4 (0,1 – 0,9)	0,5 (0,1 – 1,3)
Selen	DL	DL
Tellur	DL	DL
Zinn	DL	DL
Blei	1,5 (0,5 – 4,4)	2,5 (0,8 – 8,3)
Quecksilber	DL	DL

DL, unter Detektions-Limit

Wie aus Tab. 16 ersichtlich, konnten in der Gasphase der inkubierten Fäzes-Proben vor und nach Zugabe von CBS eine Reihe von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten der Elemente As, Sb, Sn, Te und Pb nachgewiesen werden, obwohl die Konzentrationen der entsprechenden Metall(oid)e teilweise unter der Nachweisgrenze lagen. Dies spricht dafür, dass es sich bei der Transformation von Metallen und Metalloiden durch die Darm-Mikroflora des Menschen um hoch affine Prozesse handelt.

Generell sind die Spektren der vor und nach Zugabe von CBS nachgewiesenen flüchtigen Metall(oid)-Derivate sehr ähnlich. Die beobachteten Unterschiede bei den Derivaten von As, Sb und Sn sind eher quantitativer Art und bedingt durch die Sensitivität des Nachweises.

Tab. 16: Nachweis flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes-Proben vor und nach Zugabe von CBS.

Metall(oid)	<u>Flüchtige Metall(oid)-Derivate*</u>	
	<u>Vor Zugabe von CBS</u>	<u>Nach Zugabe von CBS</u>
As	CH_3AsH_2	AsH_3 , CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$
Bi	BiH_3 , CH_3BiH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	BiH_3 , CH_3BiH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$
Sb	CH_3SbH , $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$	SbH_3 , CH_3SbH , $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$
Sn	DL	$(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$
Te	$(\text{CH}_3)_2\text{Te}$	$(\text{CH}_3)_2\text{Te}$
Pb	$(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$	$(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$

*Nachgewiesene flüchtige Metall(oid)-Derivate über eine anaerobe Inkubationsdauer von bis zu 4 Wochen; DL, unter Detektions-Limit

Tab. 17 zeigt die maximalen Produktions-Raten der verschiedenen flüchtigen Metall(oid)-Derivate, die in der Gasphase der inkubierten Fäzes-Proben nachgewiesen werden konnten. Die Raten der Transformation von Bi zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ stiegen nach der Zugabe von CBS bei allen Probanden stark an, nämlich von durchschnittlich 0,3-17 μmol auf 120-28.000 $\mu\text{mol/h/kg}$ Trockengewicht.

Für die anderen hier detektierten flüchtigen Derivate der Elemente As, Sb, Te, Pb und Sn konnten keine signifikant erhöhten Produktions-Raten nach Zugabe von CBS beobachtet werden.

Tab. 17: Maximale Produktions-Raten flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes-Proben (n = 64) vor und nach Zugabe von CBS.

<u>Maximale Produktions-Rate (µmol/h/kg TG)</u>		
<u>Metall(oid)</u>	Vor Zugabe von CBS	Nach Zugabe von CBS
	Mittelwert (Wertebereich)	Mittelwert (Wertebereich)
BiH ₃	1,4 (DL - 9,1)	4,4 (DL - 94,9)
CH ₃ BiH ₂	2,5 (DL - 17,1)	3,6 (DL - 78,3)
(CH ₃) ₂ BiH	0,6 (DL - 6,5)	0,07 (DL - 0,8)
(CH ₃) ₃ Bi	3,8 (0,3 - 17,1)	2.108 (120 - 28.739)
AsH ₃	DL	1,4 (DL - 46)
CH ₃ AsH ₂	0,03 (DL - 0,3)	5 (DL - 132,8)
(CH ₃) ₂ AsH	DL	0,9 (DL - 18,1)
(CH ₃) ₃ As	DL	0,7 (DL - 13,5)
SbH ₃	DL	0,02 (DL - 0,3)
CH ₃ SbH	0,1 (DL - 1,1)	0,5 (DL - 8,4)
(CH ₃) ₃ Sb	0,4 (DL - 2)	4,6 (DL - 96,5)
(CH ₃) ₂ Te	54,3 (DL - 374,9)	40 (DL - 657)
(CH ₃) ₄ Pb	0,03 (DL - 0,3)	1,3 (DL - 17,2)
(CH ₃) ₄ Sn	DL	0,05 (DL - 1,1)

DL, unter Detektions-Limit

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Bi-Gehalt und (CH₃)₃Bi-Konzentration der Fäzes-Proben besteht, wurden nur Proben nach CBS-Zugabe mit einem Bi-Gehalt > 1 mmol/kg TG berücksichtigt.

Wie in Abb. 11 zu erkennen, konnte unter Einbezug der Gesamtheit der Proben keine signifikante Korrelation (R = -0,12) zwischen Bi-Gehalt und (CH₃)₃Bi-Produktion festgestellt werden.

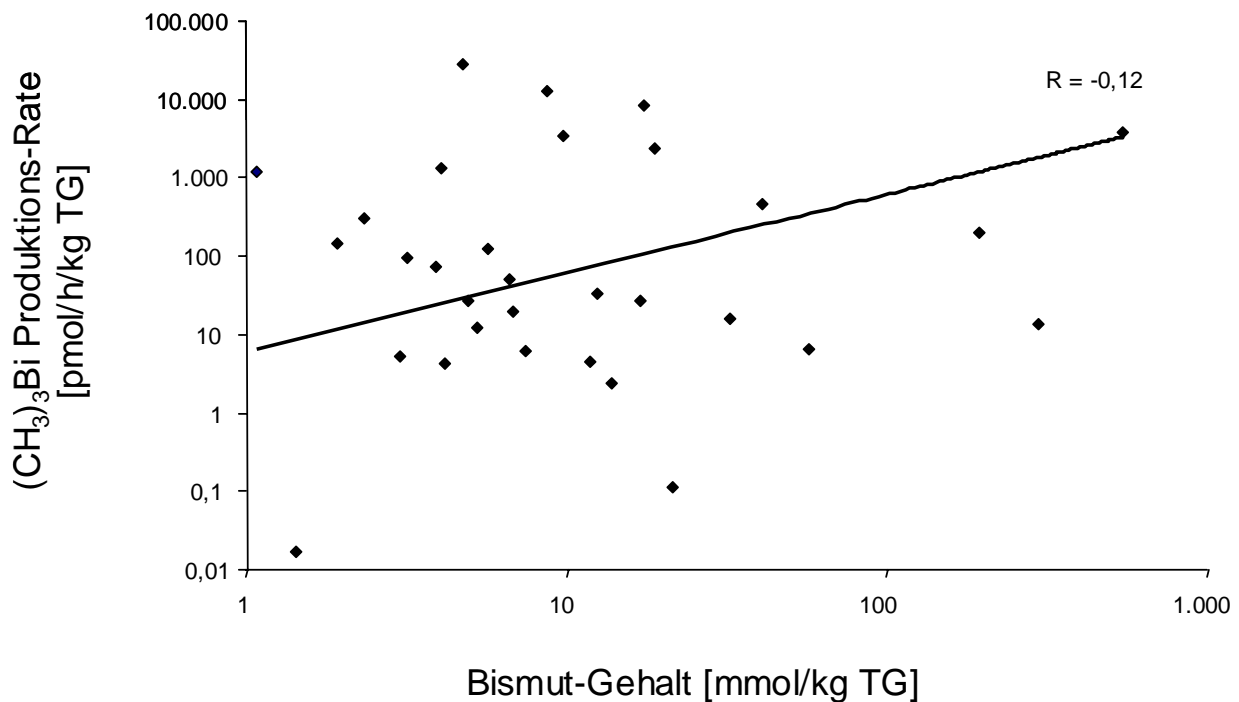


Abb. 11: Zusammenhang zwischen Bi-Gehalt und (CH₃)₃Bi-Produktion der Fäzes-Proben. Dargestellt sind alle Fäzes-Proben nach CBS-Zugabe, die einen Bi-Gehalt > 1 mmol/kg TG aufwiesen (n = 31).

Auch nach Differenzierung der Proben entsprechend ihrer Methylierungs-Aktivität in stark methylierende (>500 pmol (CH₃)₃Bi/h/kg TG) und schwach methylierende (<500 pmol (CH₃)₃Bi/h/kg TG) Fäzes-Proben konnte für keine der beiden Gruppen eine Korrelation zwischen (CH₃)₃Bi-Produktion und Bi-Gehalt der Proben nachgewiesen werden (R = -0,75 und R = -0,29) (Michalke et al., in Vorbereitung).

3.2.2 Produktion von Methan in anaerob inkubierten Fäzes-Proben

Aufgrund zurückliegender Studien, nach denen sich Methanoarchaea als sehr leistungsfähig in der Transformation von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Derivaten erwiesen (Gadd, 1993; Michalke et al., 2000, 2002, 2003; Bentley et al., 2002; Thayer, 2002; Craig, 2003), wurden in dieser Studie die anaerob inkubierten Fäzes-Proben auch auf die Produktion von CH₄ untersucht, um auf einen eventuellen

Zusammenhang zwischen Methanogenese und der Biotransformation von Metall(oid)en zu prüfen.

In allen untersuchten Fäzes-Proben der 14 Probanden konnte die Produktion von CH_4 nachgewiesen werden. Die maximalen CH_4 Produktions-Raten lagen dabei zwischen 24 (Proband ML) und 4000 $\mu\text{mol CH}_4/\text{h/kg TG}$ (Proband LS).

Hinweise darauf, dass mit erhöhter CH_4 -Produktion der Probanden auch ein Anstieg der Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate einherging, ließen sich, außer in Einzelfällen, nicht bestätigen (Abb. 12, $R = 0,02$).

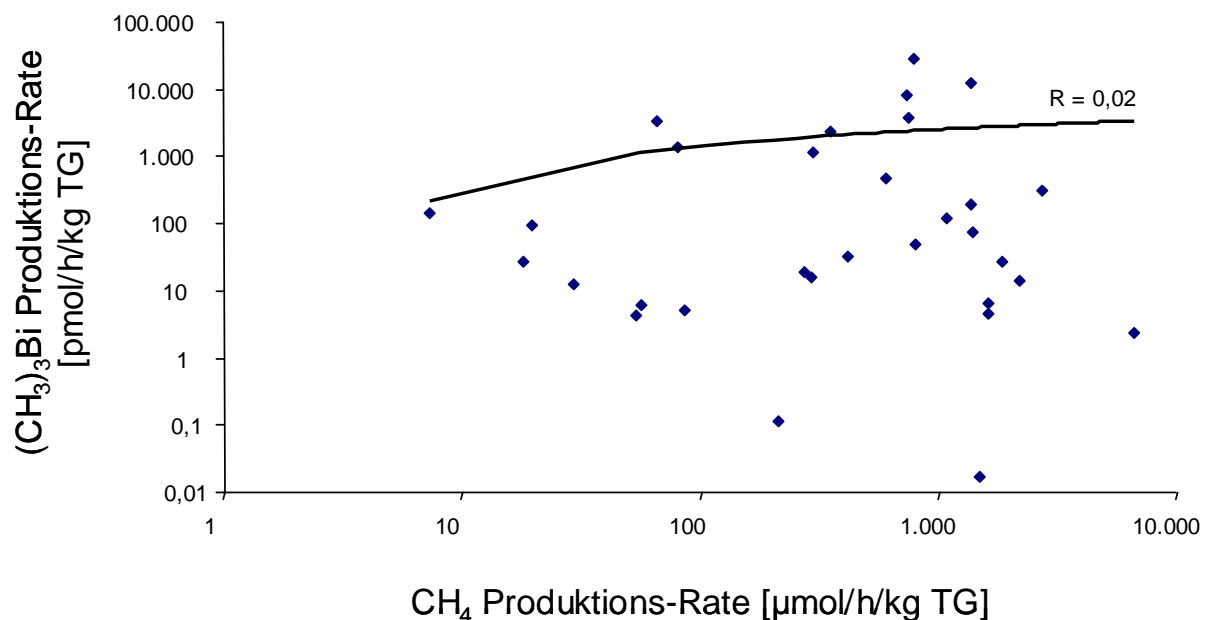


Abb. 12: Zusammenhang zwischen CH_4 -Produktion und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion der Fäzes-Proben. Dargestellt sind alle Fäzes-Proben nach CBS-Zugabe, die einen Bi-Gehalt $> 1 \text{ mmol/kg TG}$ aufwiesen ($n = 31$).

Statistische Untersuchungen unter Berücksichtigung der maximalen CH_4 und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ Produktions-Raten schwach methylierender ($< 500 \text{ pmol } (\text{CH}_3)_3\text{Bi/h/kg TG}$) und stark methylierender ($> 500 \text{ pmol/h/kg } (\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ / $R = 0,0001$) Fäzes-Proben ergaben für keine der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation zwischen der CH_4 -Produktion und der Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ($R = 0,32$ und $R = 0,0001$) (Michalke et al., in Vorbereitung).

3.2.3 Untersuchungen zur Mikroflora-Zusammensetzung der Humanfäzes-Proben über SSCP

In der vorliegenden Arbeit wurde die SSCP (single strand conformation polymorphism)-Methodik angewandt, um Einblick in die Zusammensetzung der Metall(oid) derivatisierenden Mikroflora des menschlichen Darms zu erhalten und um einzelne mikrobielle Vertreter durch Sequenzierung der aufgetrennten rDNS-Fragmente zu identifizieren.

Die SSCP-Untersuchungen sollten zunächst klären, ob sich die Zusammensetzung der Darm-Mikroflora der Probanden durch die Einnahme von CBS verändert.

Abb. 13 zeigt das Banden-Muster der 16S rDNS von 6 Fäzes-Proben des Probanden MLow, das die Diversität der Gesamt-Mikroflora und der archaealen Population widerspiegelt. Probe MLow0 stellt die Kontroll-Probe vor Einnahme von CBS dar, die Proben MLow 1-6 bezeichnen Fäzes-Proben, die bis zu 38 h nach der Bismut-Verabreichung genommen wurden.

Die aus den 6 Fäzes-Proben extrahierte DNS wurde jeweils mit einem Primer-Paar für die Gesamt-Mikroflora (COM1 und COM2ph), d.h. für alle Prokaryonten, und mit einem Archaea-spezifischen Primer-Paar (109f und 915r) amplifiziert.

Wie in Abb. 13 zu sehen, bleiben die Bandenmuster der 16S rDNS-Fragmente der Gesamt-Population und der archaealen Population über die Zeit von 38 h nach Bi-Applikation weitgehend stabil. Dies deutet daraufhin, dass das den Probanden zu Beginn der Studie verabreichte CBS keine kurzfristigen im SSCP-Profil sichtbaren Veränderungen der Zusammensetzung der Fäzes-Mikroflora verursachte.

Die Stabilität der Bandenmuster der Fäzes-Proben über den Zeitraum von 38 h scheint vorhergehenden Studien zu entsprechen, die besagen, dass die Darm-Mikroflora in ihrer Individualität und ihrer Zusammensetzung über längere Zeiträume sehr stabil ist (Franks et al., 1998; Zoetendal et al., 1998). Nicht auszuschließen ist, dass Auswirkungen der Bi-Applikation auf die Darm-Mikroflora erst später eintreten.

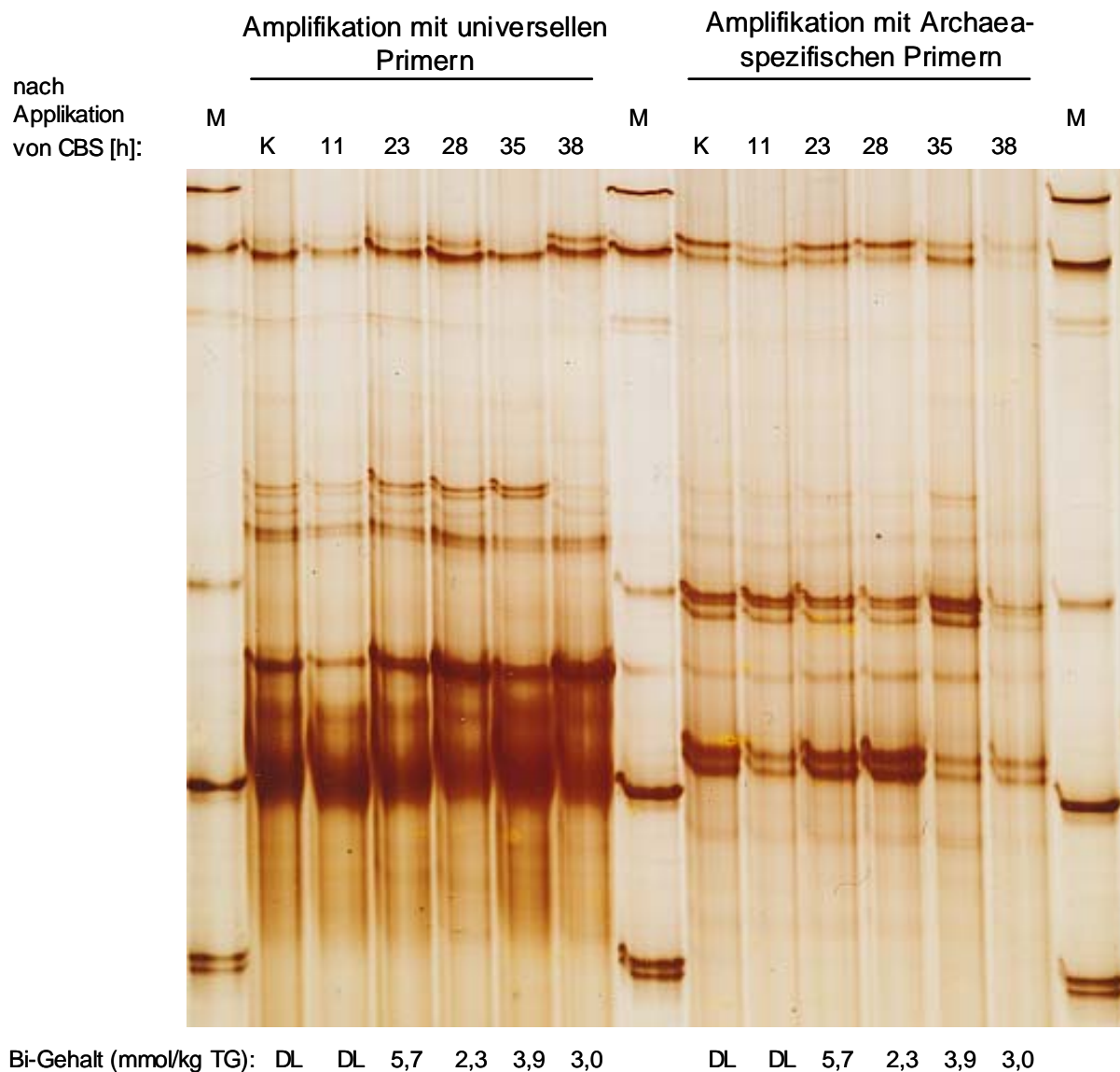


Abb. 13: SSCP-Profil der 16S rDNS der Fäzes-Proben von Proband MLow nach Amplifikation mit universellen Primern (Zielpopulation: Bacteria und Archaea) und durch Nested-PCR Amplifikationen mittels Archaea-spezifischer Primer (Zielpopulation: Archaea). K, Kontroll-Probe vor Einnahme von CBS. DL, unter Detektions-Limit. M, Marker.

Weitere SSCP-Untersuchungen wurden durchgeführt, um Einblicke in die Diversität der Methanoarchaea zu erhalten.

Tab. 18: Primer-Kombinationen, die zur Amplifikation der 16S rDNS der archaealen-, der methanoarchaealen- und der Gesamtpopulation aus Humanfäzes-Proben eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	Annealing Temperatur (°C)	Spezifität	Literatur
Arch f364	CCT ACG GGR BGC AGC AGG	58	Archaea	Skillman et al., 2006
Arch r1386	GCG GTG TGT GCA AGG AGC			
21f	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	52	Archaea	De Long, 1992
958r	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T			
ARC-8F	TCC GGT TGA TCC TGC C	55	Archaea	Teske et al., 2002 Kane et al., 1993
1492r	GGC TAC CTT GTT ACG ACT T			
109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	52	Archaea	Banning et al., 2005
915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT			
Met 86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	58	Methanoarchaea	Wright et al., 2004
Met1340r	CGG TGT GTG CAA GGA G			
COM1	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	52	Gesamt-Population der Prokaryonten	Schwieger et al., 1998
COM2ph	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT			

Als Primer-Kombinationen, mit denen die spezifischsten Amplifikations-Produkte der 16S rDNS aus Humanfäzes erhalten werden konnten, erwiesen sich in dieser Studie das Archaea-spezifische Primer-Paar 21f/958r und das Methanoarchaea-spezifische Primer-Paar 86f/1340r. Die restlichen Primer-Kombinationen zeigten entweder keine Produkte oder nur unspezifische Amplifikations-Produkte. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die extrahierte DNS aller Fäzes-Proben dieser Studie mittels der oben genannten Primer-Kombinationen amplifiziert.

Abb. 14 zeigt ein SSCP-Profil mit der aufgetrennten archaealen und methanoarchaealen einzelsträngigen 16S rDNS aus Fäzes-Proben der Probanden MLow, AP, KV und CS.

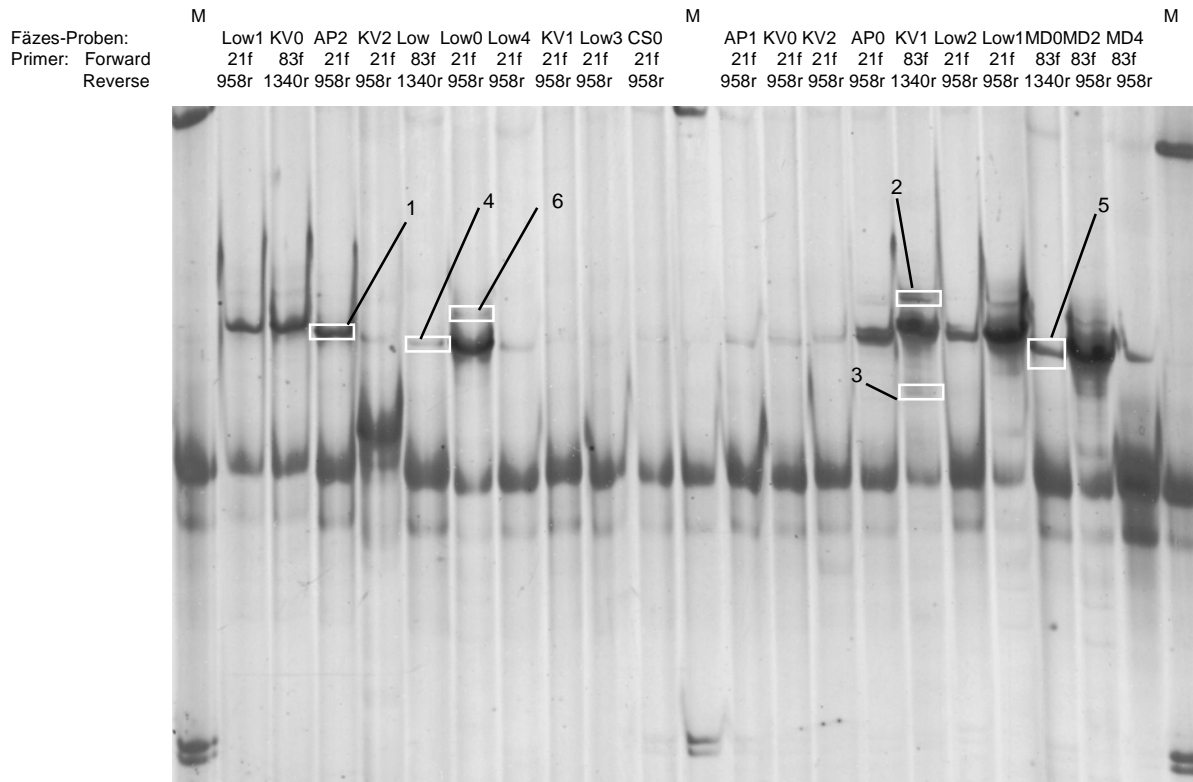


Abb. 14: SSCP-Profil gelelektrophoretischer Auftrennung der 16S rDNS-Fragmente, die mit Archaea-spezifischen Primern aus Fäzes-Proben von den Probanden MLow, CS, KV und AP gewonnen wurden. 1-6 bezeichnen die Fragmente, für die die 16S rDNS-Sequenz ermittelt wurde. M, Marker.

Zur Sequenzierung der 16S rDNS-Fragmente wurde die DNS aus verschiedenen Banden des SSCP-Profiles extrahiert und reamplifiziert. In Abb. 14 sind die extrahierten Fragmente, für die die 16S rDNS-Sequenzen ermittelt werden konnten, mit 1-6 gekennzeichnet. Sequenzierungsversuche weiterer Banden blieben erfolglos. In Tab. 19 sind die 6 16S rDNS-Fragmente aufgelistet und ihre Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten 16S rDNS-Fragmenten angegeben. Weiter ist die vermutete Gattungszugehörigkeit dargestellt.

Überraschend ist das Auftreten einer bacterialen Sequenz (3), das mit einer unspezifischen Amplifikation der archaealen Primer erklärt werden muss.

Sequenz 6, die die höchste Sequenzähnlichkeit zur Gattung *Pyrobaculum* aufwies, unterstützt die Annahme, dass Crenarchaeota auch in mesophilen Habitaten weiter verbreitet sind als bisher angenommen. So konnten in einer zurückliegenden Studie aus Humanfäzes-Proben 16S rDNS-Fragmente nachgewiesen werden, die die höchste Sequenzähnlichkeit zu unkultivierten crenarchaealen Klonen oder zur Gattung *Sulfolobus* zeigten (Rieu-Lesme et al., 2005).

Tab. 19: Amplifizierte 16S rDNS-Fragmente aus Humanfäzes und phylogenetische Interpretation der Sequenzdaten.

<u>Banden-Nummer</u> (siehe Abb. 14)	<u>Höchste Sequenzähnlichkeit (%) / Quelle /</u> <u>Accession No.</u>	<u>nächst verwandte</u> <u>Gattung</u>
1	Unkultivierter archaealer Klon K15f-4sF (98 %) / Human-Fäzes (Lange et al., unpublished) / Accession No.: AY907211	<i>Methanobrevibacter</i>
2	Haloarchaeon Stamm T3.1 (97 %) / Salzlagerstätte (McGenity et al., 2000) / Accession No.: AJ270234	<i>Halobacterium</i>
3	Unkultiviertes Bacterium Klon SLM7 (99 %) / Boden (Shivaji et al., unpublished) / Accession No.: EU034427	<i>Propionibacterium</i>
4	Unkultivierter archaealer Klon K15f-4sF (99 %) / Human-Fäzes (Lange et al., unpublished) / Accession No.: AY907211	<i>Methanobrevibacter</i>
5	Unkultivierter archaealer Klon K15f-4sF (99 %) / Human-Fäzes (Lange et al., unpublished) / Accession No.: AY907211	<i>Methanobrevibacter</i>
6	<i>Pyrobaculum</i> sp. WIJ3 (97 %) / Solfatare (Huber et al., unpublished) / Accession No.: AJ277125	<i>Pyrobaculum</i>

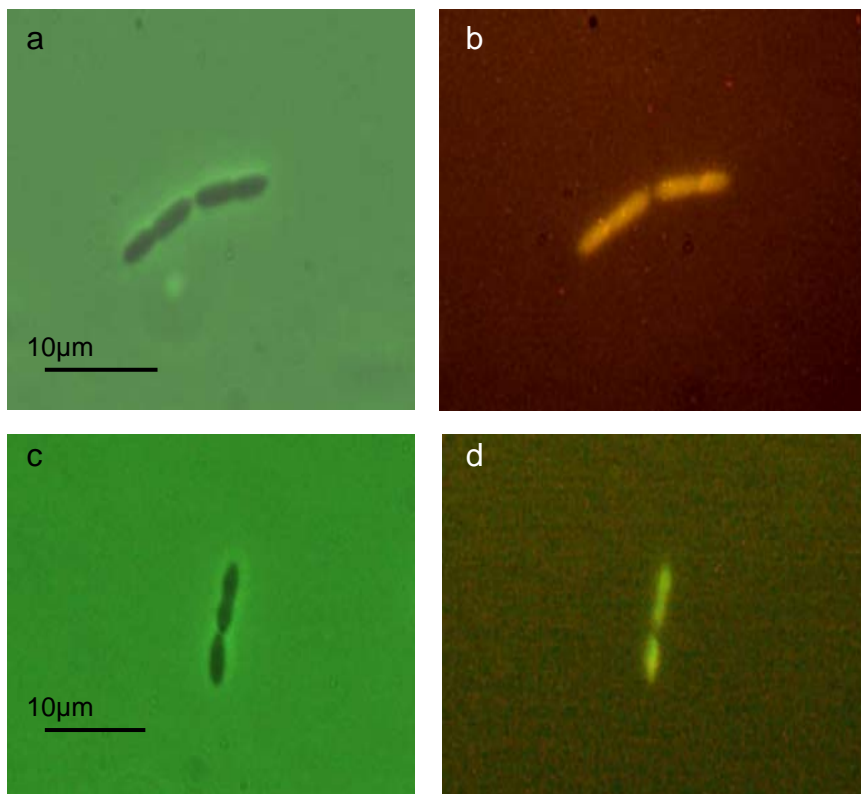
Die Sequenzen, die aus den SSCP-Banden 1, 4 und 5 ermittelt werden konnten, bestätigen das in vorhergehenden Studien nachgewiesene Vorkommen von Methanoarchaea der Gattung *Methanobrevibacter* in Habitaten des menschlichen Körpers, wie dem menschlichen Darm, der Mundhöhle und der Vagina (Belay et al., 1990; Ferrari et al., 1994; Kulik et al., 2001; Eckburg et al., 2005).

3.2.4 Versuche zur Anreicherung von Methanoarchaea aus Humanfäzes

Im Laufe der Untersuchungen wurden Anstrengungen unternommen Methanoarchaea aus Humanfäzes zu isolieren. Hierzu wurden Versuche mit Verdünnungsreihen mit verschiedenen Medien, die zur Anreicherung von Methanoarchaea geeignet sind, durchgeführt. Zur Unterdrückung des Wachstums von Bacteria wurden die Antibiotika Cephalosporin, Cephalotin, Ampicillin und Kanamycin in Konzentrationen von 0,1 bis 400 µg/ml eingesetzt.

Für diese Untersuchungen wurden Fäzes-Proben ausgewählt, die innerhalb dieser Probandenstudie möglichst hohe CH₄ Produktions-Raten (>900 µmol/h/kg TG) aufwiesen.

Bisher konnten nur Anreicherungskulturen von Methanoarchaea mit einer Präsenz an der Gesamtkeimzahl von bis zu 50 % generiert werden. Abb. 15 zeigt mikroskopische Aufnahmen einiger Morphotypen von Methanoarchaea verschiedener Anreicherungskulturen.



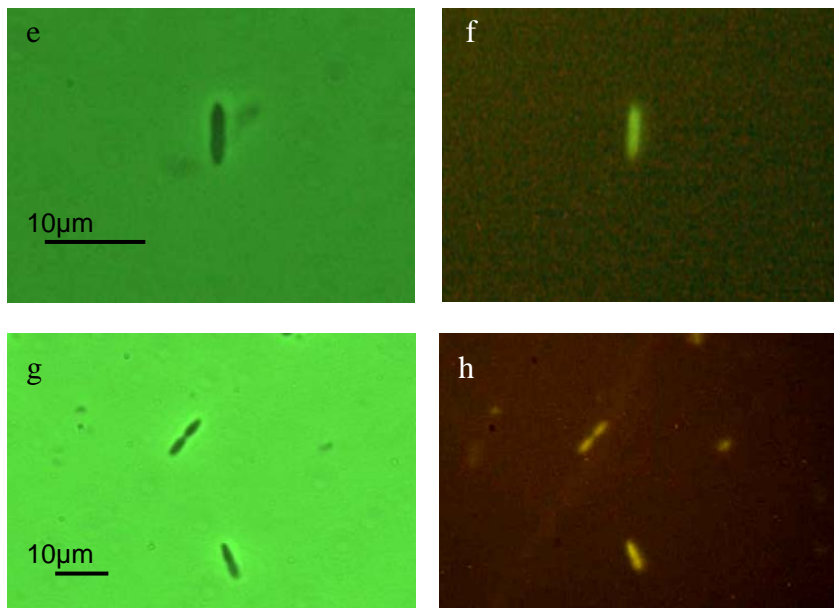


Abb. 15 a-h: Digitale Phasenkontrast- (a, c, e, g) u. Epi-
fluoreszenz-Aufnahmen (b, d, f, h) von
Methanoarchaea aus Humanfäzes
-Anreicherungskulturen (Vergrößerung 1250 x).

3.3 Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate durch Reinkulturen von Methanoarchaea und Bacteria

Um Einblicke in die Fähigkeit der Mikroflora des menschlichen Darms zur Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate zu erhalten, wurden Versuche zur Biotransformation mit Reinkulturen methanoarchaealer und bacterialer Organismen durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf Vertreter der Methanoarchaea der menschlichen Darmflora gerichtet. So wurden hier die beiden einzigen bis heute bekannten methanogenen Vertreter der menschlichen Darmflora, *Methanobrevibacter smithii* und *Methanosphaera stadtmanae*, gemeinsam mit 14 bacterialen Vertretern der menschlichen Darmflora untersucht (Tab. 20).

Tab. 20: In dieser Untersuchung eingesetzte bacteriale Stämme und ihre taxonomische Zugehörigkeit.

Domäne Bacteria		
<u>Division</u>	<u>Gattung</u>	<u>Art</u>
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>alcalophilus</i>
	<i>Butyrivibrio</i>	<i>crossotus</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>aceticum</i>
		<i>leptum</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
	<i>Ruminococcus</i>	<i>hansenii</i>
Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>	<i>piger</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	<i>coprocola</i>
		<i>thetaitaomicron</i>
		<i>vulgatus</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>
	<i>Collinsella</i>	<i>intestinalis</i>
	<i>Eubacterium</i>	<i>biforme</i>
		<i>eligans</i>

Zusätzlich zu *M. smithii* und *M. stadtmanae* wurden in dieser Studie 9 weitere Methanoarchaea aus verschiedenen ökologischen Nischen, wie z.B. aus Faulschlamm oder Sedimenten (Tab. 21), auf ihre Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten untersucht, um Hinweise darauf zu erhalten, ob es sich bei der Metall(oid)-Derivatisierung um eine für die Methanoarchaea generell zutreffende Fähigkeit handelt.

Tab. 21: In dieser Untersuchung eingesetzte Methanoarchaea und ihre taxonomische Zugehörigkeit.

Domäne Archaea				
Phylum Euryarchaeota				
Methanoarchaea				
Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art
<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>formicum</i>
			<i>Methanobrevibacter</i>	<i>smithii</i>
			<i>Methanosphaera</i>	<i>stadtmanae</i>
			<i>Methanothermobacter</i>	<i>thermautotrophicus</i>
<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>maripaludis</i>
				<i>vannielii</i>
	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanolacinia</i>	<i>paynteri</i>
	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanoplanus</i>	<i>limicola</i>
			<i>Methanosarcina</i>	<i>barkeri</i>
				<i>mazei</i>
			<i>Methanolobus</i>	<i>tindarius</i>

Um das Wachstum der Organismen zu verfolgen, wurde für Kulturen bacterialer Organismen die optische Dichte bestimmt. Die optische Dichte konnte für Kulturen der Methanoarchaea nicht als Maß für das Wachstum herangezogen werden, da die meisten hier kultivierten Stämme Aggregate bilden und daher keine direkte Beziehung zur Zelldichte besteht. Stattdessen wurde begleitend die Produktion von CH₄ als Parameter für die physiologische Aktivität der Methanoarchaea bestimmt. Abb. 16 zeigt typische Zeitverläufe der CH₄-Produktion (a) bzw. des Wachstums (b) der in dieser Untersuchung inkubierten Reinkulturen methanoarchaealer und bacterialer Organismen.

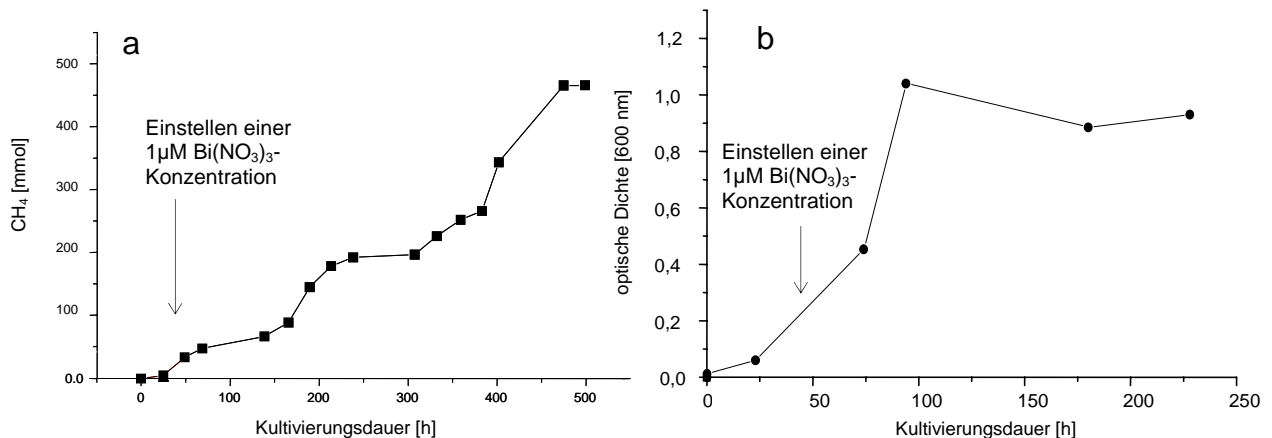


Abb. 16 a-b: Verlauf der CH_4 -Produktion in anaerob inkubierten *M. vanniellii*-Kulturen (a) und der optischen Dichte in anaerob gezogenen *Bacteroides vulgatus*-Kulturen (b). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe der $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung an.

Die wachsenden Kulturen der Methanoarchaea und Bacteria wurden mit den Metall(oid)-Salzen $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, SbCl_3 , SeO_2 , TeO_2 , HgCl_2 , KH_2AsO_4 versetzt (Endkonzentration: $1\ \mu\text{M}$) und in regelmäßigen Abständen auf die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate untersucht.

Bei keiner der in dieser Studie getesteten Reinkulturen konnte die Bildung von Methyl- oder Hydrid-Quecksilber-Derivaten nachgewiesen werden. Lediglich elementares Quecksilber konnte detektiert werden. Da dieses jedoch nicht nur in wachsenden Reinkulturen, sondern auch in Steril-Kontrollen detektiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um rein chemisch gebildetes elementares Quecksilber handelt und nicht auf Reduktions-Reaktionen von Mikroorganismen basiert.

Wie in Tab. 22 a zu sehen, sind die Vertreter der Methanoarchaea generell sehr leistungsfähig in Bezug auf die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate. Die Mehrheit der Methanoarchaea, inklusive *M. smithii* und *M. stadtmanae*, sind in der Lage die 5 Elemente As, Sb, Bi, Se und Te zu mehreren flüchtigen Derivaten zu transformieren. Weniger produktiv waren die Methanoarchaea *M. maripaludis*, *M. paynteri* und *M. tindarius*, für die keine Arsen-Metabolisierung nachgewiesen werden konnte. Die Ausnahme unter den Methanoarchaea bildet *M. thermautotrophicus*, der lediglich Arsen und Antimon zu $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ und $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ transformierte und somit ein sehr eingeschränktes Volatilisierungsmuster aufweist. Möglicherweise hängt dies jedoch mit der hohen Wachstumstemperatur von 65°C zusammen, die Einfluss auf die Stabilität der produzierten flüchtigen Derivate haben könnte.

Tab. 22 a-b: Flüchtige Metall(oid)-Derivate, die nach Zusatz einer Standardlösung der Metall(oid)-Salze von As, Sb, Bi, Se, Te und Hg durch methanoarchaeale und bacteriale Kulturen produziert wurden.

a

Flüchtige Metall(oid)-Derivate							
Mikroorganismen	Arsen	Selen	Tellur	Antimon	Bismut	Herkunft der Stämme	Quelle
Methanoarchaea							
<i>Methanospiraera stadmanae</i> ^b DSM 3091 ^T	(CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX ^a	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	CH ₃ BiH ₂ , (CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	Humanfäzes	diese Studie
<i>Methanobrevibacter smithii</i> ^b DSM 2374	CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX ^a	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	CH ₃ BiH ₂ , (CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	Humanfäzes	diese Studie
<i>Methanococcus vannielii</i> DSM 1224 ^T	CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As, AsX ^a	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	CH ₃ BiH ₂ , (CH ₃) ₃ Bi	mariner Schlamm	diese Studie
<i>Methanococcus maripaludis</i> DSM 2771	DL	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	Schlamm	diese Studie
<i>Methanolacinia paynteri</i> DSM 2545 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX ^a	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	marines Sediment	diese Studie
<i>Methanolobus tindarius</i> DSM 2278 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se, SeX ^a	(CH ₃) ₂ Te	CH ₃ SbH ₂ , (CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₃ Bi	Sediment	diese Studie
<i>Methanoplanus limicola</i> DSM 2279 ^T	(CH ₃) ₃ As	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX ^a	(CH ₃) ₂ Te, TeX ^a	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₃ Bi	Schlamm	diese Studie
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM 800 ^T	AsH ₃ , AsX ^a	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	DL	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₃ Bi ^c	anaerober Faulschlamm	Michalke et al., 2000
<i>Methanosarcina mazei</i> DSM 3647	(CH ₃) ₃ As	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₃ Bi	anaerober Faulschlamm	F. Thomas, unpublished
<i>Methanobacterium formicicum</i> DSM 1535 ^T	AsH ₃ , CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As, AsX ^a	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Te	SbH ₃ , CH ₃ SbH ₂ , (CH ₃) ₂ SbH, (CH ₃) ₃ Sb	BiH ₃ , CH ₃ BiH ₂ , (CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	anaerober Faulschlamm	Michalke et al., 2000
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> DSM 1053 ^T	AsH ₃	DL	DL	(CH ₃) ₃ Sb	DL	Faulschlamm	Michalke et al., 2000

^a nicht identifizierte flüchtige Verbindungen

^b Teil der menschlichen Darmflora

^c nur mit Octamethylcyclotetrasiloxan oder mit den Ionophoren Lasalocid und Monensin

DL, unter Detektions-Limit

b

Mikroorganismen	Flüchtige Metall(oid)-Derivate						Quelle
	Arsen	Selen	Tellur	Antimon	Bismut	Herkunft der Stämme	
Bacteria							
<i>Bacillus alcalophilus</i> ^a							
DSM 485 ^T	DL	DL	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Bacteroides coprocola</i> ^a							
DSM 17136 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Te	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ^a							
DSM 2079 ^T	DL	DL	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Bacteroides vulgatus</i> ^a							
DSM 1447 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₃ Sb	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a							
DSM 20082	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Butyrivibrio crossotus</i> ^a DSM 2876 ^T	DL	DL	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Clostridium acetium</i> ^a							
DSM 1496 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se	(CH ₃) ₂ Te	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Clostridium leptum</i> ^a							
DSM 753 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ Se ₂	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Collinsella intestinalis</i> ^a							
DSM 13280 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Desulfovibrio piger</i> ^a							
DSM 749	DL	DL	DL	DL	(CH ₃) ₃ Bi	Humanfäzes	diese Studie
<i>Eubacterium biforme</i> ^a							
DSM 3989 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se	(CH ₃) ₂ Te	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie
<i>Eubacterium eligens</i> ^a							
DSM 3376 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂	(CH ₃) ₂ Te	DL	(CH ₃) ₃ Bi	Humanfäzes	diese Studie
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a							
DSM 20079 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se	(CH ₃) ₂ Te	DL	(CH ₃) ₃ Bi	Humanfäzes	diese Studie
<i>Ruminococcus hansenii</i> ^a DSM 20583 ^T	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂	DL	DL	DL	Humanfäzes	diese Studie

^a Teil der menschlichen Darmflora

DL, unter Detektions-Limit

Verglichen mit den Methanoarchaea scheinen die hier getesteten Bacteria in ihrer Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten, sowohl in Bezug auf das Spektrum verflüchtigter Elemente als auch in Bezug auf die Bandbreite der produzierten flüchtigen Derivate limitiert zu sein (Tab. 22 b). So konnten in der Gasphase von *B. crossotus*, *B. alcalophilus* und *B. thetaiotaomicron* keine flüchtigen Metall(oid)-Spezies festgestellt werden. Die Mehrheit der hier getesteten Bacteria (10 von 14 Stämmen) sind in der Lage Selen zu volatilisieren, 6 volatilisieren Tellur, 1 Vertreter (*B. vulgatus*) produziert $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ und 3 Bacteria, *L. acidophilus*, *E. eligens*, *D. piger* sind in der Lage Bismut zu verflüchtigen.

Wie in Tab. 23 a und b dargestellt, spiegelt sich die höhere Transformations-Fähigkeit der Methanoarchaea gegenüber den Bacteria auch in ihren Derivatisierungs-Raten wider. Für diesen Vergleich wurde Selen gewählt, welches von nahezu allen Bacteria transformiert wurde. Zusätzlich wurden die Umsetzungs-Raten von anorganischem Bismut zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ermittelt, da es sich hier um eine Reaktion handelt, die auch Belange der menschlichen Gesundheit betrifft, da die Anwendung von Bismut in pharmazeutischen Produkten zunimmt und da sein permethyliertes Produkt $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ eine nachgewiesene Toxizität besitzt (Sollmann et al., 1939). Tab. 23 a und b zeigt, dass die Derivatisierungs-Raten beider Elemente in der Regel für die Methanoarchaea höher sind als im Vergleich zu den hier untersuchten Bacteria. Die Transformations-Raten für Bismut zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ liegen für die Methanoarchaea zwischen 0,6 fmol/h (*M. paynteri*) und ca. 4 pmol/h (*M. formicicum*), wohingegen die hier getesteten Bacteria entweder keine oder minimale Bismut-Methylierung aufwiesen. Die Selen Transformations-Raten lagen mit 0,3 bis ca. 800 pmol/h ebenfalls im Mittel höher für die methanoarchaealen Stämme verglichen mit den bacterialen mit 1,9 bis 34 pmol/h.

Somit scheinen die Methanoarchaea im Vergleich zu den Bacteria generell durch ein höheres Volatilisierungs-Potenzial auch bezüglich der Produktions-Raten ausgezeichnet zu sein.

Tab. 23 a-b: Maximale Bismut- und Selen-Volatilisierungsraten von methanoarchaealen (a) und bacterialen (b) Reinkulturen.

a

Methanoarchaea	Maximale Produktions-Raten (fmol/h)	
	Bismut-Derivate	Selen-Derivate
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ^b	(CH ₃) ₃ Bi: 182,0	(CH ₃) ₂ Se: 462,0 (CH ₃) ₂ SeS: 5,1 (CH ₃) ₂ Se ₂ : 9,0 SeX: 0,6 ^c
<i>Methanobrevibacter smithii</i> ^b	(CH ₃) ₃ Bi: 165,7	(CH ₃) ₂ Se: 365,6 (CH ₃) ₂ SeS: 1,2 (CH ₃) ₂ Se ₂ : 1,4 SeX: 0,6 ^c
<i>Methanococcus vannielii</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 311,0	(CH ₃) ₂ Se: 833,0 (CH ₃) ₂ SeS: 1,3
<i>Methanococcus maripaludis</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 110,0	(CH ₃) ₂ Se: 124,0 (CH ₃) ₂ SeS: 1,5
<i>Methanolacinia paynteri</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 0,6	(CH ₃) ₂ Se: 179,0 (CH ₃) ₂ SeS: 0,3 (CH ₃) ₂ Se ₂ : 3,8 SeX: 0,5 ^c
<i>Methanolobus tindarius</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 62,0	(CH ₃) ₂ Se: 321,0 SeX: 0,3 ^c
<i>Methanoplanus limicola</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 2,4	(CH ₃) ₂ Se: 577,0 (CH ₃) ₂ SeS: 23,0 (CH ₃) ₂ Se ₂ : 6,4 SeX: 2,6 ^c
<i>Methanosarcina barkeri</i> ^a	(CH ₃) ₃ Bi: 2.296,0	DL
<i>Methanosarcina mazei</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 2.057,0	DL
<i>Methanobacterium formicicum</i>	(CH ₃) ₃ Bi: 4.258,0	DL
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	DL	DL

^a nur in Gegenwart von Octamethylcyclotetrasiloxan, Lasalocid oder Monensin

^b Teil der menschlichen Darmflora

^c nicht identifizierte flüchtige Selen-Derivate

DL, unter Detektions-Limit

b

Bacteria	Maximale Produktions-Raten (fmol/h)	
	Bismut-Derivate	Selen-Derivate
<i>Bacteroides vulgatus</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se: 2,6
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂ : 10,3
<i>Butyrivibrio crossotus</i> ^b	DL	DL
<i>Bacillus alcalophilus</i> ^b	DL	DL
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ^b	DL	DL
<i>Clostridium aceticum</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se: 2,2
<i>Clostridium leptum</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se: 34,6
		(CH ₃) ₂ Se ₂ : 9,5
<i>Collinsella intestinalis</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂ : 2,6
<i>Desulfovibrio piger</i> ^b	(CH ₃) ₃ Bi: 0,1	DL
<i>Eubacterium biforme</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se: 1,9
<i>Eubacterium eligens</i> ^b	(CH ₃) ₃ Bi: 8,1	(CH ₃) ₂ Se ₂ : 19,2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^b	(CH ₃) ₃ Bi: 1,9	(CH ₃) ₂ Se: 3,5
<i>Ruminococcus hansenii</i> ^b	DL	(CH ₃) ₂ Se ₂ : 2,9

^b Teil der menschlichen Darmflora

DL, unter Detektions-Limit

3.3.1 Einfluss von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ auf das Wachstum von *B. thetaiotaomicron*

Um Hinweise auf toxische Effekte von Metall(oid)-Derivaten auf die Mikroflora des menschlichen Darms zu erhalten, wurde der Hemmeffekt von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ auf wachsende Reinkulturen von *B. thetaiotaomicron* geprüft.

Wie in Abb. 17 zu erkennen, zeigte sich eine deutliche Hemmung des Wachstums von *B. thetaiotaomicron* ab einer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration von 5,7 nM. So weist die Kultur, die einer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration von 17 nM ausgesetzt war, nach 12 Stunden Inkubation eine nur noch halb so hohe optische Dichte wie die Kontroll-Kultur auf.

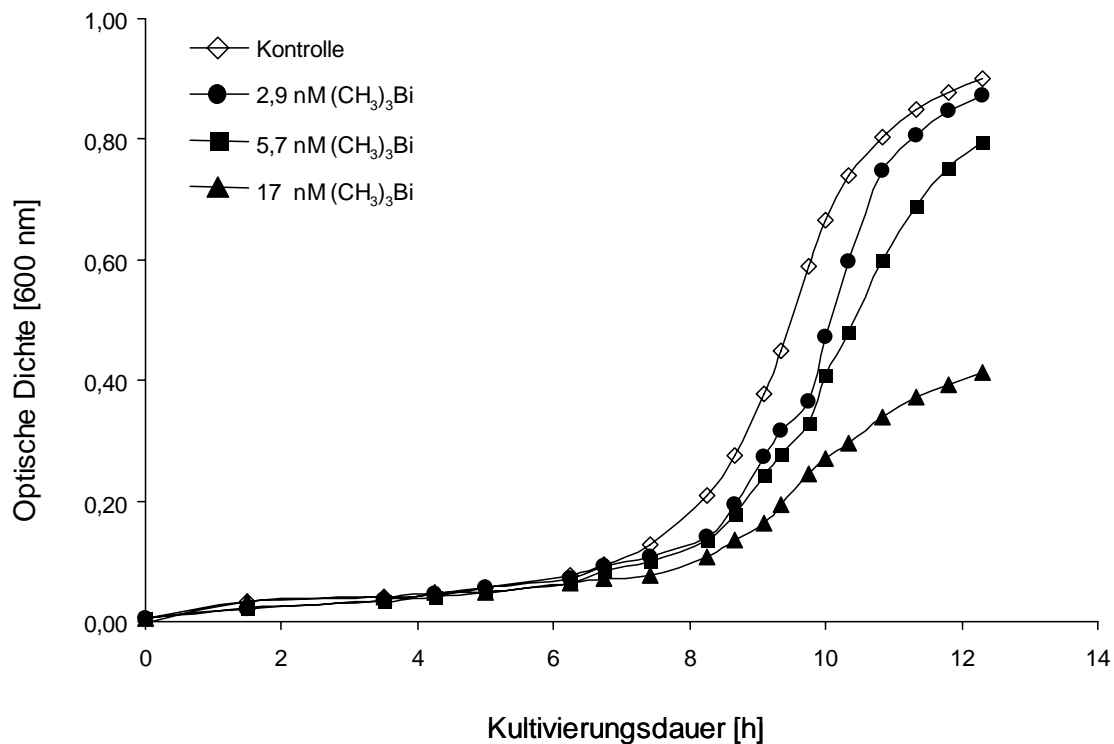


Abb. 17: Einfluss von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ auf das Wachstum von *B. thetaiotaomicron* (n=3).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zum Verständnis der Rolle der Prokaryonten bei der Derivatisierung von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Derivaten dar. Durch *ex situ* Ansätze sollte die Kapazität dieser Prozesse, Metalle und Metalloide in flüchtige Metall(oid)-Derivate zu überführen, nachgewiesen und Einblick in die beteiligten Organismen erhalten werden. Mit den beiden Habitaten, Böden und menschlicher Darm, wurde der Akzent dieser Arbeit auf die Transformation von Metall(oid)en in anaeroben Habitaten gelegt. Beide Habitate bieten Mikroorganismen gute Wachstums-Bedingungen und zeichnen sich daher durch hohe Zellzahlen von Prokaryonten aus. Andererseits unterscheiden sie sich in einer Reihe chemikalischer und physikalischer Parameter, wie z.B. Temperatur, Wassergehalt, Nährstoff-Verfügbarkeit, pH-Wert oder Metall(oid)-Verfügbarkeit. Sie weisen daher unterschiedliche Mikrofloren-Zusammensetzungen auf.

Die Fähigkeit der Mikroflora des jeweiligen Habitats zur Transformation von Metall(oid)en wurde an Eigenisolaten und an Stämmen, deren Herkunft aus den jeweiligen Habitaten verbürgt ist und die von Stammsammlungen bezogen wurden, geprüft.

Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus Böden

Untersuchungsobjekte für diesen Teilaspekt der Arbeit waren Böden zweier Standorte, einem Auengley und einem Industrie-Boden. Für den mit Metall(oid)en hochbelasteten Industrie-Boden konnten außer den Se-Verbindungen $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ und $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$, die mit hoher Wahrscheinlichkeit abiotischen Ursprungs sind, keine flüchtigen Metall(oid)-Derivate nachgewiesen werden.

Es ist anzunehmen, dass die Belastung durch die Metall(oid)e so hoch ist, dass biologische Umsetzungen weitgehend unterdrückt werden. Für eine deutliche Organismenarmut spricht, dass in Isolierungs-Versuchen von Prokaryonten aus Proben des Industrie-Bodens keine Isolate gewonnen werden konnten und dass in mikroskopischen Untersuchungen nur vereinzelt Mikroorganismen festgestellt wurden. Auch vorhergehende Untersuchungen beschreiben einen geringen Gehalt

an Biomasse und eine geringe Diversität der Mikrofloren Metall-belasteter Böden (Giller et al., 1997). Insbesondere Bacteria scheinen durch hohe Metall-Konzentrationen stärker geschädigt zu werden als eukaryontische Mikroorganismen-Gemeinschaften (Rajapaksha et al., 2004).

In den schwach mit Metall(oid)en belasteten Auengley-Proben hingegen wurden eine ganze Reihe flüchtiger Metall(oid)-Derivate nachgewiesen. Vergleicht man die in anaerob inkubierten Auengley-Proben nachgewiesenen flüchtigen Metall(oid)-Derivate mit anderen Habitaten, wie z.B. Humanfäzes oder Faulschlamm (Michalke et al., 2000), ist die Vielfalt der detektierten flüchtigen Metall(oid)-Derivate für den Auengley höher als für die anderen beiden Habitate (Tab. 24). So fanden sich meist mehrere flüchtige Derivate der Elemente As, Bi, Sb, Se, Sn, Te, Pb und Hg. Zusätzlich wurden unbekannte flüchtige Verbindungen der Elemente As, Se und Te detektiert.

In der Gasphase inkubierter Faulschlamm-Proben (Michalke et al., 2000) hingegen fanden sich keine flüchtigen Selen- und Blei-Derivate; weiterhin wurde, mit Ausnahme von As, lediglich nur ein flüchtiges Derivat des jeweiligen Elements nachgewiesen. Ähnlich eingeschränkt ist das Spektrum der flüchtigen Metall(oid)-Derivate für die inkubierten Humanfäzes-Proben, in denen keine flüchtigen Derivate der Elemente Se und Hg detektiert werden konnten.

Tab. 24: Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus einem Auengley im Vergleich zu anderen Habitaten.

Metall(oid)e	<u>Flüchtige Metall(oid)-Derivate</u>		
	Auengley	Faulschlamm (Michalke et al., 2000)	Humanfäzes vor Einnahme von CBS
As	AsH ₃ , CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As, AsX, AsY	AsH ₃ , CH ₃ AsH ₂ , (CH ₃) ₂ AsH, (CH ₃) ₃ As	CH ₃ AsH ₂
Bi	(CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi	(CH ₃) ₃ Bi	BiH ₃ , CH ₃ BiH ₂ , (CH ₃) ₂ BiH, (CH ₃) ₃ Bi
Sb	(CH ₃) ₃ Sb	(CH ₃) ₃ Sb	CH ₃ SbH, (CH ₃) ₃ Sb
Se	CH ₃ SeH ₂ , (CH ₃) ₂ Se, (CH ₃) ₂ SeS, (CH ₃) ₂ Se ₂ , SeX, SeY	DL	DL
Sn	(CH ₃) ₃ Sn	(CH ₃) ₃ Sn	(CH ₃) ₄ Sn
Te	TeX, CH ₃ TeH ₂ , (CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₂ Te	(CH ₃) ₂ Te
Pb	(CH ₃) ₄ Pb, PbX	DL	(CH ₃) ₄ Pb
Hg	Hg ⁰ , (CH ₃) ₂ Hg	Hg ⁰	DL

DL, unter Detektions-Limit

Auch die dominant auftretenden Derivate unterscheiden sich für die unterschiedlichen Habitate, so sind es für den Auengley $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, AsH_3 , CH_3AsH_2 und $(\text{CH}_3)_3\text{As}$, für den Faulschlamm $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ und AsH_3 und für die Humanfäzes-Proben CH_3BiH_2 , $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ und $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$.

Anzunehmen ist, dass die Vielfalt der Metall(oid)-Derivate als auch die Quantität dieser Derivate in direkter Beziehung zu den unterschiedlichen Milieu-Bedingungen der verschiedenen Habitate stehen. Insbesondere die Verfügbarkeit von Metall(oid)en für die Biotransformation durch Mikroorganismen wird durch verschiedene physiko-chemische Parameter beeinflusst. Z.B. hat der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Löslichkeit von Metall(oid)en: Bei einigen Metall(oid)en steigt die Löslichkeit mit fallendem pH, bei anderen mit steigendem pH. Organische Verbindungen hingegen können über Chelatbildung die Bioverfügbarkeit von Metall(oid)en mindern. Zudem liegen die Metall(oid)e in unterschiedlicher chemischer Form vor (z.B. elementar oder als Carbonate, Sulfate, Nitrate), diese wiederum weisen unterschiedliche Lösungsverhalten und somit auch voneinander abweichende Bioverfügbarkeit auf.

Auch die Intensität der mikrobiellen Aktivität und die Diversität der Mikrofloren hängen von physiko-chemischen Parametern wie Wassergehalt, pH-Wert, Temperatur, Redox-Potenzial oder auch Substrat-Verfügbarkeit ab und unterscheiden sich von Habitat zu Habitat.

Für Boden-Habitate wird angenommen, dass sie Vertreter von 20 oder mehr bacterialen Divisionen beheimaten (Dunbar et al., 2002) und Zelldichten von ca. 10^9 Zellen pro g Boden (Whitman et al., 1998) erreichen. Dagegen scheinen im menschlichen Darmbereich nur Vertreter von 8 Divisionen aufzutreten (Seksik et al., 2003); die Zelldichte liegt dagegen wesentlich höher als in Boden-Habitaten.

Die Beobachtung, dass zu Anfang der Inkubation der Auengley-Proben flüchtige Selen-Derivate produziert wurden, diese nach längerer Inkubation verstärkt auftretenden As- und Sb-Derivaten wichen, muß mit den hier vorliegenden Inkubations-Bedingungen in einem geschlossenen System erklärt werden. So ändern sich über den Zeitraum der Inkubation die Milieu-Bedingungen, insbesondere in Bezug auf den pH-Wert, das Redox-Potenzial und die Substratverfügbarkeit. Diese

Parameter beeinflussen wiederum die Aktivität und die Zusammensetzung der Mikroflora, die für die Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate verantwortlich ist.

Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate durch Boden-Isolate

Um das Potenzial von Mikroorganismen der Auengley-Mikroflora zur Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate zu bestimmen, wurden klassische Isolierungs-Experimente durchgeführt. So konnten 10 Stämme aus diesem Boden isoliert werden (9 bakterielle Isolate (ASI-1; BodEx 1 bis 8) und 1 methanoarchaeales Isolat (SPArch)), die auf ihre Befähigung zur Volatilisierung von Metall(oid)en untersucht wurden. Das bakterielle Boden-Isolat ASI-1 wies die höchsten Produktions-Raten und die höchste Vielfalt flüchtiger Metall(oid)-Derivate auf, die bacterialen Isolate BodEx 1 bis 8 erwiesen sich als wesentlich ineffizienter (Tab. 11).

Die Beobachtung, dass das Spektrum der durch ASI-1 produzierten flüchtigen Metall(oid)-Derivate dem des Auengleys sehr stark ähnelte sowie Ergebnisse von FISH-Analysen, die ein *in situ* Vorkommen von ASI-1 im Auengley von ca. 2 % ergaben, lassen eine maßgebliche Beteiligung von ASI-1 an der Volatilisierung von Metall(oid)en in dem hier untersuchten Boden vermuten.

Überraschenderweise konnten für das einzige methanoarchaeale Boden-Isolat SPArch keine flüchtigen Metall(oid)-Derivate nachgewiesen werden; dies scheint im Widerspruch zu Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu stehen, die den Methanoarchaea eine dominierende Rolle in der Verflüchtigung von Metall(oid)en in anaeroben Habitaten zuschreibt. So konnte in Versuchen mit Reinkulturen von verschiedenen Methanoarchaea im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Methanoarchaea im Allgemeinen eine hohe Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en haben. Ausnahmen von dieser Regel sind sicher denkbar, so weist z.B. auch *M. paynteri* (Tab. 23a) nur ein enges Spektrum flüchtiger Metall(oid)-Derivate auf.

Umgekehrt zeigt die Studie am Beispiel von ASI-1, dass Prokaryonten außerhalb der Methanoarchaea in der Lage sind sehr effizient Metall(oid)e in flüchtige Derivate zu transformieren und das Potenzial der Biotransformation nicht auf die Methanoarchaea beschränkt ist.

Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate in Humanfäzes-Proben

Motiviert durch Studien, die flüchtigen Metall(oid)-Derivaten eine höhere Toxizität im Vergleich zu ihren Edukten zuweisen, sollte in dieser Arbeit das Potenzial der menschlichen Darm-Mikroflora zur Produktion flüchtiger Metall(oid)-Derivate erfasst werden. Zu diesem Zweck wurden Fäzes-Proben auf die Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten vor und nach Zugabe von Bismut in Form von CBS untersucht. Interessanterweise konnten bereits in Kontroll-Proben vor Zugabe von CBS die Freisetzung verschiedener Metall(oid)-Derivate der Elemente As, Sb, Bi, Sn, Te und Pb nachgewiesen werden (Tab. 24). Diese Beobachtung lässt auf hoch affine Transformations-Reaktionen der beteiligten Mikroflora schließen. So wurde schon in Untersuchungen von Michalke et al. (2000) die Biotransformation von Bismut zu flüchtigen Derivaten als hoch affin beschrieben.

Die unterschiedlich hohen Produktions-Raten für die flüchtigen Derivate der verschiedenen Elemente (Tab. 17) beruhen vermutlich auch darauf, dass die Elemente unterschiedlich effizient von den Mikroorganismen aufgenommen werden und dass die Element-Spezifität der Methylierung der Mikroorganismen dadurch sehr unterschiedlich ist.

Nach Zugabe von CBS stiegen die Raten der Transformation von Bi zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in allen Fäzes-Proben stark an. Allerdings ließ sich für die Gesamtheit der Fäzes-Proben, mit Ausnahme von einzelnen Fäzes-Proben, keine eindeutige Korrelation zwischen Metall(oid)-Gehalt und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktions-Raten feststellen (Korrelationskoeffizient $R = -0,12$). Auch für die Gruppen von stark Bi-methylierenden ($R = -0,75$) und schwach Bi-methylierenden ($R = -0,29$) Fäzes-Proben liess sich kein Zusammenhang zum Bi-Gehalt erkennen.

Es ist anzunehmen, dass die bestimmten Bi-Konzentrationen nicht der bioverfügbaren Bi-Konzentration entsprechen. So sind eine Reihe von Milieu-Faktoren denkbar, die die Verfügbarkeit von Metall(oid)en im menschlichen Darm beeinflussen können. Als erstes sind hier die unterschiedlichen Nahrungsgewohnheiten der verschiedenen Probanden zu nennen, die über die Zufuhr verschiedener Substrate für die Darm-Mikroflora zu unterschiedlichen Milieu-Bedingungen führen, wie z.B. pH-Wert, Redox-Potenzial und Vorliegen organischer Verbindungen. Diese Milieu-Bedingungen beeinflussen wiederum die Verfügbarkeit

von Metall(oid)en und damit auch die Biotransformation von Metall(oid)en. Zum anderen nehmen sicher auch veranlagungsbedingte Faktoren Einfluss auf das Darm-Milieu und damit auch auf die Bioverfügbarkeit der Metall(oid)e.

CH₄ in Humanfäzes-Proben und die Bedeutung der Methanoarchaea in der Biotransformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten

Da für die Gruppe der Methanoarchaea die Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en bekannt ist, wurden die Fäzes-Proben auf die Produktion von CH₄ untersucht, um auf die Anwesenheit dieser Organismen zu prüfen. Zurückliegende Probandenstudien lassen vermuten, dass der menschliche Intestinaltrakt von ca. 30-80 % der Erdbevölkerung auch mit Methanoarchaea besiedelt ist (Pitt et al., 1980; Segal et al., 1988; Hudson et al., 1993; Hackstein, 1995). In diesen Studien wurde allerdings der Atem der Probanden auf CH₄ untersucht, nicht wie in der vorliegenden Arbeit der Fäzes der Probanden. So wird vermutet, dass mit dieser deutlich weniger sensitiven Nachweismethode im Atem nur hohe Zellzahlen von Methanoarchaea festgestellt werden können (Miller et al., 1982; Maczulak et al., 1989). Neuere Studien, basierend auf 16S rDNS-Untersuchungen von Humanfäzes, sprechen für ein obligates Vorkommen von Methanoarchaea im menschlichen Intestinaltrakt (Eckburg et al., 2005).

Als Bestätigung dieser Annahme konnte in der vorliegenden Studie in allen Fäzes-Proben die Produktion von CH₄ nachgewiesen werden.

Um diesem Verdacht nachzugehen, dass Methanoarchaea maßgeblich an der Biotransformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten beteiligt sind, wurden Reinkulturen von verschiedenen Vertretern der Methanoarchaea und Bacteria untersucht, die dem menschlichen Darm zugeordnet werden.

Generell wiesen die Reinkulturen der Methanoarchaea im Vergleich zu den hier untersuchten Bacteria eine höhere Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten auf. Auch die beiden methanogenen Vertreter der menschlichen Darmflora, *M. smithii* und *M. stadtmanae*, erwiesen sich als sehr produktiv in der Volatilisierung von Metall(oid)en.

Auch wenn die Zelldichte der Methanoarchaea im menschlichen Darm mit 10^3 - 10^{10} /g Trockengewicht (Brusa et al, 1993) im Vergleich zu den Bacteria eher gering ist, ist

es dennoch möglich, dass sie maßgeblich an der Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten beteiligt sind, da die Stoffwechsel-Aktivität von Mikroorganismen nicht mit ihrer Zellzahl korreliert sein muß (Tarras, 2002).

Trotz der naheliegenden Vermutung, dass Vertreter der Methanoarchaea hauptverantwortlich für die beobachtete Biotransformation der Metall(oid)e sein könnten, fehlen dafür klare Indizien. So ließen statistische Auswertungen keine signifikante Korrelation zwischen CH_4 -Produktion und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion erkennen. Grund hierfür könnte - ähnlich wie im Falle der diskutierten Abhängigkeit zwischen Bi-Gehalt und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion dargestellt - eine multifaktorielle Abhängigkeit der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion sein.

Gesundheitliche Gefährdung durch die Biotransformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten im menschlichen Darm

Da flüchtige Metall(oid)-Derivate gewöhnlich eine höhere Toxizität als ihre anorganischen Edukte aufweisen, ist generell eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch die Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten zu erwarten. Denkbar sind Schädigungen der menschlichen Zellen, insbesondere der Darmepithel-Zellen. Weiterhin ist die Schädigung bzw. Hemmung der physiologischen Darmflora und damit auch die Unterdrückung positiver Einflüsse der physiologischen Darmflora auf die Funktion des menschlichen Intestinaltrakts möglich.

Die Darm-Mikroflora spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Menschen, so wird angenommen, dass die physiologische Darm-Mikroflora einen positiven Einfluß auf die Integrität des Darmepithels hat (Hooper, 2004; Ismail et al., 2005). Untersuchungen an Mäusen, Ratten und Fischen, die ohne ihre natürliche Darm-Mikroflora unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, zeigten die Wichtigkeit der Darm-Mikroflora für die normale Darm-Struktur und -Funktion, die Nährstoff-Absorption, die Fett-Deposition und die Entwicklung der normalen Immunität (Falk et al., 1998; Guarner et al., 2003; Bäckhed et al., 2004, 2005; Rawls et al., 2004).

Um Hinweise auf den Einfluss von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten auf die Darm-Mikroflora zu erhalten, wurden wachsenden Kulturen von *B. thetaiotaomicron*, der

einen Vertreter der physiologischen Darmflora des Menschen darstellt, verschiedenen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen ausgesetzt.

Dabei konnte eine deutliche Hemmung des Wachstums von *B. thetaiotaomicron* ab einer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration von 5,7 nM festgestellt werden. Wenn man in Betracht zieht, dass Organismen methanoarchaealer Reinkulturen in anaeroben Inkubations-Experimenten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen bis zu 0,5 nM akkumulieren, erscheint eine Hemmung der Darm-Mikroflora durch $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ unwahrscheinlich. Betrachtet man jedoch die hohe Zelldichte der Darm-Population, so ist die Übertragung von Metall(oid)-Derivaten durch direkten Zellkontakt durchaus denkbar und somit auch ein toxischer Effekt bei weitaus geringeren Konzentrationen zu erwarten. Damit wäre denkbar, dass die Produktion von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten nicht nur zu einer direkten Schädigung menschlicher Zellen führt, sondern auch unsere Gesundheit indirekt über die Störung der physiologischen Darmflora beeinträchtigt.

5. Zusammenfassung

Die Freisetzung flüchtiger Metall(oid)-Derivate aus natürlichen Habitaten stellt ein in toxikologischer Hinsicht nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotenzial dar, da die gasförmigen Produkte oftmals toxischer sind als ihre anorganischen Edukte. Sie besitzen zudem eine hohe Mobilität und können damit unkontrolliert verbreitet werden. In dieser Arbeit sollte die biogene Entstehung flüchtiger Metall(oid)-Derivate in unterschiedlichen Habitaten untersucht werden. Zum einen sollten Einblicke in die Fähigkeit der Gesamt-Mikroflora zur Transformation von Metall(oid)en erhalten werden, zum anderen sollten einzelne, für diese Transformations-Reaktionen verantwortliche Prokaryonten identifiziert werden. Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass in anaerob inkubierten Proben von Böden (Auengley, Industrie-Boden) und menschlichen Fäzes eine Vielzahl von flüchtigen Metall(oid)-Derivaten freigesetzt werden. Durch Steril-Kontrollen wurde belegt, dass die hier nachgewiesenen flüchtigen Metall(oid)-Derivate, mit Ausnahme der flüchtigen Selen-Verbindungen $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ und $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$, biogenen Ursprungs sind.

Verschiedenen Vertretern der Bacteria und Archaea (Methanoarchaea), die als typisch für das jeweilige Habitat angesehen werden können oder aus diesem isoliert wurden, konnte die Fähigkeit, Metall(oid)e zu flüchtigen Derivaten zu transformieren, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass dem Prozess der Biotransformation hoch affine Reaktionen zugrunde liegen, die bei sehr geringen Konzentrationen der entsprechenden Metall(oid)-Spezies ablaufen.

Aus Proben eines Auengley konnte ein Stamm von *C. glycolicum* isoliert werden, der eine offensichtlich dominante Rolle bei der Biotransformation von Metall(oid)en in diesem Habitat spielt. Hinweise auf eine Beteiligung der Methanoarchaea an der Volatilisierung von Metall(oid)en liessen sich nicht erkennen, da in den inkubierten Boden-Proben kein CH_4 nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte das den Methanoarchaea zuzuordnende Boden-Isolat SPArch keine Fähigkeit zur Transformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten.

Wenn auch nicht statistisch abgesichert, scheinen dagegen Vertreter der Methanoarchaea im Bereich des menschlichen Darms deutlichen Einfluss auf die Transformation von Metall(oid)en zu nehmen. Weiter deuten die vorliegenden Untersuchungen daraufhin, dass die im menschlichen Darm produzierten flüchtigen Metall(oid)-Derivate nicht nur die Gesundheit durch Schädigung der körpereigenen Zellen beeinträchtigen können, sondern auch durch Störungen der physiologischen Darmflora.

6. Literaturverzeichnis

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Miller, Z.W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search Programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1919-1925.

Andrewes, P., Kitchin, K.T., Wallace, K. Plasmid DNA damage caused by stibine and trimethylstibine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194 (2004) 41-48.

Bakir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N.Y., Tikriti, S., Dhahir, H.I., Clarkson, T.W., Smith, J.C., Doherty, R.A. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science.* 181 (1973) 230-241.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 15718–15723.

Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science.* 307 (2005) 1915-1920.

Banning, N., Brock, F., Fry, J.C., Parkes, R.J., Hornibrook, E.R.C., Weightman, A.J. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 947-960.

Belay, N., Mukhopadhyay, B., de Macario, E.C., Galask, R., Daniels, L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 1666–1668.

Bentley, R., Chasteen, T.G. Microbial methylation of metal(loid)s: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 250-271.

Bintrim, S.B., Donohue, T.J., Handelsman, J., Roberts, G.P., Goodman, R.M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (1997) 277-282.

Boening, D.W. Ecological Effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere.* 40 (2000) 1335-1351.

Brusa, T., Canzi, E., Allievi, L., Del Puppo, E., Ferrari, A. Methanogens in the Human Intestinal Tract and Oral Cavity. *Curr. Microbiol.* 27 (1993) 261–265.

Buge, A., Rancurel, G., Poisson, M., Dechy, H. Encephalopathies myocloniques par les sels de bismuth. *Nouv. Presse Méd.* 3 (1974) 2315-2320.

Burns, R., Thomas, D.W., Barrow, V.J. Reversible encephalopathy possibly associated with bismuth subgallate ingestion. *Br. Med. J.* 1 (1974) 220-223.

Challenger, F., Higginbottom, C., Ellis, L. The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. *J. Chem. Soc.* 5 (1933) 95-101.

Challenger, F. Biological methylation. *Chem. Rev.* 36 (1945) 315-318.

Chamkha, M., Labat, M., Patel, B.K., Garcia, J.L. Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 2049-2054.

Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriology.* 44 (1994) 812-826.

Craig, P.J. (ed.). *Organometallic compounds in the environment*, 2nd Edition, John Wiley & Sons (2003).

DeLong, E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 5685-5689.

Dopp, E., Hartmann, L.M., Florea, A.M., von Recklinghausen, U., Pieper, R., Shokouhi, B., Rettenmeier, A.W., Hirner, A.V., Obe, G. Uptake of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals and association with cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201 (2004) 156-165.

Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3035-3045.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 308 (2005) 1635-1638.

Ehrenstein, C., Shu, P., Wickenheiser, E.B., Hirner, A.V., Dolfen, M., Emons, H., Obe, G. Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chemico-Biological Interactions*. 141 (2002) 259-274.

Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 1157–1170.

Feldmann, J., Grümping, R., Hirner, A.V. Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 228-234.

Feldmann, J., Hirner, A.V. Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 60 (1995) 339-359.

Feldmann, J. A calibration method for the analysis of volatile metal(loid) species in environmental gas samples by using GC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 1069-1076.

Fender, H. und Wolf, G. Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites. Toxicol. Lett. 96-97 (1998) 149-154.

Ferrari, A., Brusa, T., Rutili, A., Canzi, E., Biavati, B. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. Curr. Microbiol. 29 (1994) 7-12.

Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 3336–3345.

Gadd, G.M. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. FEMS Microbiol. 11 (1993) 297-316.

Ganther, H.E. Enzymatic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts. Biochemistry. 3 (1966) 1089-1098.

Gaston, L.W., Stadtman, E.R. Fermentation of Ethylene Glycol by *Clostridium glycolycum* SP. N. J. Bacteriol. 85 (1963) 356-362.

Giller, K.E., Witter, E., MCGrath, S.P. Toxicity of Heavy Metals to Microorganisms and Microbial Processes in Agricultural Soils: A Review. Soil Biol. Biochem. 30 (1997) 1389-1414.

Guarner, F., Malagelada, J.R. Gut flora in health and disease. Lancet. 361 (2003) 512–519.

Hackstein, J. H., Van Alen, T.A., Op Den Camp, H., Smits, A., Mariman, E. Intestinal methanogenesis in primates - a genetic and evolutionary approach. Dtsch Tierärztl. Wschr. 102 (1995) 152-154.

Hallas, L.E., Cooney, J.J. Tin and tin-resistant microorganisms in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981a) 466-471.

Hallas, L.E., Cooney, J.J. Effects of stannic chloride and organotin compounds on estuarine microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.* 22 (1981b) 529-535.

Hathaway G.J., Proctor N.H., Hughes J.P., Fischman, M.L. Proctor and Hughes' Chemical hazards of the workplace. 3rd edition. New York, NY: Van Nostrand Reinhold (1991).

Hicks, R.E., Amann, R.I., Stahl, D.A. Dual staining of natural bacterioplankton with 49,6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2158–2163.

Hirner, A.V., Feldmann, J., Krupp, E., Grümping, R., Goguel, R., Cullen, W.R. Metal(loid)organic compounds in geothermal gases and waters. *Organic Geochem.* 29 (1998) 1765-1778.

Hirner, A.V., Hartmann, L.M., Hippler, J., Koesters, J., Michalke, K., Sulkowski, M., Rettenmeier, A.W. Organometal(loid) compounds associated with human metabolism. In: Hirner, A.V., Emons, H. (eds.). *Organic metal and metalloid species in the environment: Analysis, distribution, processes and toxicological evaluation*. Springer-Verlag, Heidelberg (2004).

Hooper, L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12 (2004) 129-134.

Hudson, M.J., Tomkins, A.M., Wiggins, H.S., Drasar, B.S. Breath methane excretion and intestinal methanogenesis in children and adults in rural Nigeria. *Scand. J. Gastroenterol.* 28 (1993) 993-998.

Ismail, A.S., Hooper, L.V. Epithelial cells and their neighbours. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289 (2005) 779-784.

Jurgens, G. Molecular phylogeny of Archaea in boreal forest soil, freshwater and temperate estuarine sediment. Dissertation. Helsinki (2002).

Kaksonen, A.H., Plumb, J.J., Robertson, W.J., Franzmann, P.D., Gibson, J.A.E., Puhakka, J.A. Culturable diversity and community fatty acid profiling of sulfate-reducing fluidized-bed reactors treating acidic, metal-containing wastewater. *Geomicrobiol. J.* 21 (2004) 469-480.

Kane, M., Poulsen, L.K., Stahl, D.A. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 682–686.

Klimecki, W. T., Carter, D. E. Arsine toxicity: chemical and mechanistic implications. *J. Toxicol. Environ. Health.* 46 (1995) 399-409.

Kösters, J., Hippler, J., Diaz-Bohne, R.A., Hirner, A.V. Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds. *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 996-999.

Kulik, E. M., Sandmeier, H., Hinni, K., Meyer, J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by pcr amplification and sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 196 (2001) 129–133.

Küsel, K., Karnholz, A., Trinkwalter, T., Devereux, R., Acker, G., Drake, H.L. Physiological Ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an Aerotolerant Acetogen Isolated from Sea Grass Roots, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4734-4741.

Laden B.P., Porter T.D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J. Lipid Res.* 42 (2001) 235-40.

Lee, D.H., Noh, S.A., Kim, C.K. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3112-3120.

Leonard, A., Lauwery, R.R. Carcinogenicity, tetragenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation Research.* 75 (1980) 49-62.

Luke, G.T., Tedeschi, M.D. The Minamata disease. *Am. J. For. Med. Pat.* 3 (1982) 335-338.

Maczulak, A.E., Wolin, M.J., Miller, T.L. Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2468-2473.

Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 171-173.

McGenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, W.D., Stan-Lotter, H. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol.* 2 (2000) 243-250.

Meyer, J., Schmidt, A., Michalke, K., Hensel, R. Volatilisation of Metals and Metalloids by the Microbial Population of an Alluvial Soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 30 (2007) 229-238.

Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., Hensel, R. Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2791-2796.

Michalke, K., Meyer, J., Hirner, A.V., Hensel, R. Biomethylation of bismuth by the methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 221-227.

Michalke, K., Hensel, R. Microbial biotransformations of metal(loid)s. In: Hirner, A.V., Emons, H. (eds.). „Organic metal and metalloid species in the Environment: Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation“. Springer-Verlag, Heidelberg. (2003) 137-150.

Michalke, K., Meyer, J., Hensel, R. Methylation metal(loid)s by Methanoarchaea: production of volatile derivatives with high ecotoxicological impact and health concern. In: Garrett, R.A., Klenk, H.P. (eds.). Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology. Blackwell Publishing. (2007) 285-293.

Miller, T.L., Wolin, M.J. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. Appl. Environ. Microbiol. 43 (1982) 227-232.

Miller, T.L., Wolin, M.J. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. Arch. Microbiol. 141 (1985) 116-122.

Min, H., Zhao, Y.H., Chen, M.C., Zhao, Y. Methanogens in paddy rice soil. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 49 (1997) 163-169.

Noach, L.A., Eekhof, J.L., Bour, L.J., Posthumus Meyjes, F.E., Tytgat, G.N., Ongerboer de Visser, B.W. Bismuth salts and neurotoxicity. A randomised, single-blind and controlled study. Hum. Exp. Toxicol. 14 (1995) 349-55.

Pettibone, G.W., Cooney, J.J. Effect of organotins on fecal pollution indicator organisms. Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986) 562-566.

Pettibone, G.W., Cooney, J.J. Toxicity of methyltins to microbial populations in estuarine sediments. J. Ind. Microbiol. 2 (1988) 373-378.

Pitt, P., de Bruijn, K.M., Beeching, M.F., Goldberg, E., Blendis, L.M. Studies on breath methane: the effect of ethnic origins and lactulose. Gut. 21 (1980) 951-954.

Rajapaksha, R.M.C.P., Tobor-Kaplon, M.A., Baath, E. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Appl. Env. Microbiol.* 70 (2004) 2966-2973.

Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 4596–4601.

Rieu-Lesme, F., Delbes, C., Sollelis, L. Recovery of Partial 16S rDNA Sequences Suggests the Presence of *Crenarchaeota* in the Human Digestive Ecosystem. *Curr. Microbiol.* 51 (2005) 317-321.

Sandaa, R., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30 (1999) 237-251.

Savage, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31 (1977) 107-133.

Schreiber, U., Anders, D., Koppen, J. Mixing and chemical interdiffusion of trachytic and latitic magma in a subvolcanic complex of the tertiary Westerwald (Germany). *Lithos.* 46 (1999) 695-714.

Schwieger, F., Tebbe, C.C. A new approach to utilize PCR-singlestrand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4870–4876.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* 52 (2003) 237-242.

Segal, I., Walker, A.R., Lord, S., Cummings, J.H. Breath methane and large bowel cancer risk in contrasting African populations. *Gut.* 29 (1988) 608-613.

Skillman, L.C., Evans, P.N., Strömpl, C., Joblin, K.N. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 42 (2006) 222-228.

Slikkerveer, A., de Wolf, F.A. Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.* 4 (1989) 303–323.

Sollmann, T., Seifter, J. The pharmacology of trimethyl bismuth. *J. Pharmacol. Ther.* 67 (1939) 17-49.

Stahl, D.A., Amann, R. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Jon Wiley Sons Ltd. Chichester Engl. (1991) 205-248.

Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckmann, N., Nonhoff, B., Lenke, N., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.H., Ludwig, W. ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>, Department of Microbiology Technische Universität München, München, Germany.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4799–4807.

Tarras, D. Intestinaler H₂-Metabolismus. Dissertation. FU-Berlin (2001).

Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the guaymas basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1994–2007.

Thayer, J.S. Organometallic compounds and living organisms. Academic Press, Inc., Orlando, Fla. (1984).

Thayer, J.S. Environmental chemistry of the heavy elements: hydrido and organo compounds. VCH Publishers, Incl., Weinheim, Germany (1995).

Thayer, J.S.. Biological methylation of less-studied elements. Appl. Organometal. Chem. 16 (2002) 677-691.

Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56 (1990) 782-787.

Torsvik, V., Sorheim, R., Goksoyr, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. J. Ind. Microbiol. 17 (1996) 170-178.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (1998) 6578-6583.

Wickenheiser, E.B., Michalke, K., Drescher, C., Hirner, A.V., Hensel, R. Development and application of liquid and gas-chromatographic speciation techniques with element specific (ICP-MS) detection to the study of anaerobic arsenic metabolism. Fresenius J. Anal. Chem. 362 (1998) 498-501.

Wickenheiser, E.B., Michalke, K., Hensel, R., Drescher, C., Hirner, A.V., Brutishauser, B., Bachofen, R. Volatile compounds in gases emitted from the wetland bogs near Lake Cadagno, In: Peduzzi, R., Bachofen, R., Tonolla, M. (eds.). Lake Cadagno: a meromictic lake. Documenta dell' Instituto Italiano di Idrobiologia 63 (1998a).

Wright, A.D.G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L., Smith, K.D. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 1263-1270.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., De Vos, W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3854–3859.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie I von Prof. Dr. Reinhard Hensel im Fachbereich Biologie und Geografie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Hensel für viele anregende Gespräche, die wissenschaftliche Unterstützung bei der Bearbeitung meines Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Michalke für sein Engagement und seine Geduld sowohl bei der Betreuung der theoretischen und praktischen Arbeit, als auch bei der Korrektur des Manuskripts. Er war jederzeit für mich ansprechbar und bereit mich zu unterstützen.

Herrn Prof. Dr. Alfred Vitalis Hirner (Institut für Umweltanalytik, Universität Duisburg-Essen) danke ich für die Bereitstellung der ICP-MS-Analytik und die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Burkhard (Abteilung für Bodenkunde, Universität Duisburg-Essen), Herrn Prof. Dr. Schreiber (Abteilung für Geologie, Universität Duisburg-Essen) und Herrn Dr. Tebbe (Institut für Agrarökologie, Braunschweig) für ihre Unterstützung.

Britta Tjaden und Melanie Zaparty aus dem „Frauenlabor“ für die gute Zusammenarbeit und viele anregende Gespräche. „Vize President“ Hatim Ahmed für die Hilfe an der Untersuchung des Phänomens des „schnell freeze“. Vielen Dank an Andre „Hase“ Plagens und Patrick Moritz für tiefgehende sportliche Diskussionen und an Frank „Dude“ Thomas, Thomas Knura und Britta Huber für sonstige tiefgehende Diskussionen. Weiterhin Vielen Dank an Annette Schmidt, Theresa Kouril und Sabine Effenberger für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, die mir das Laborleben so angenehm wie möglich gemacht haben: Hatim Ahmed, Karin Bendt, Fabian Blombach, Sabine Effenberger, Hildegard Eling, Britta Huber, Daniel Kehrler, Thomas Knura, Theresa Kouril, Klaus Michalke, Patrick Moritz, Annette Schmidt, Veronika Schneider, Bettina Siebers, Frank Thomas, Britta Tjaden und Melanie Zaparty.

Vielen Dank an Klaus Michalke, Frank Thomas, Britta Tjaden und meine Freundin Sandra für das Korrekturlesen.

Schließlich will ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin für ihre Geduld und ihre Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Name: Jörg Meyer

Geburtsdatum: 07.02.1971

Geburtsort: Bottrop (Knappschafts-Krankenhaus)

Eltern: Ludwig Meyer,
Volljurist

Katharina Meyer,
Lehrerin

Schulbildung: 1981 - 1990
Josef-Albers Gymnasium in Bottrop

Schulabschluss: 1990
Abitur

Zivildienst: 1990 – Ende 1991

Wichernhaus Bottrop (Kindertagesstätte)

Studium: 1992
1 Semester Geologie an der Universität Bonn

1992-1995
Grundstudium Lehramt Sekundarstufe
an der Universität Duisburg-Essen

seit 1995 Integrierter Studiengang Ökologie
an der Universität Duisburg-Essen

16.10.2002
Abschluss zum Diplomumweltwissenschaftler
Thema der Diplomarbeit: „Biomethylierung von Bismut durch
Methanosarcina barkeri“

Januar 2003 bis Oktober 2007: Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.
Hensel der Mikrobiologie I an der Universität
Duisburg-Essen

Essen, den 04.10.2007